Wechselwirkungen zwischen dem Coronardilatator Hexobendin und Plasmaproteinen

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Norbert Kolassa

Saarbrücken

1970

Druck:
Universitätsbibliothek Saarbrücken

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. W. Rummel

WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN DEM CORONARDILATATOR HEXOBENDIN UND PLASMAPROTEINEN.

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Norbert Kolassa
geb. am 18.August 1943 in Wien

Dekan: Prof. Dr. G. Dhom

Referent: Prof. Dr. K. Pfleger

Die mündliche Prüfung war am 16.6.1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41542726_0053

Meinen Eltern gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
2.	EINLEITUNG	3
3.	EXPERIMENTELLER TEIL UND BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	5
3.1.	Befunde, die zur Formulierung der Problemstellung führten	
3.1.1.	Ergebnisse	
3.1.1.1.	Zeitlicher Verlauf der Spaltung von Hexobendin im Meerschweinchenplasma	
3.1.1.2.	Spaltung von Hexobendin im Meerschweinchenplasma bei verschiedenen Konzentrationen	7
3.1.2.	Theoretische Überlegungen	9
3.2.	Charakterisierung der Bindung und Spaltung von Hexobendin im Meerschweinchenplasma	11
3.2.1.	Untersuchung der Proteinbindung unter weitgehender Ausschaltung des Einflusses der Spaltung	
3.2.1.1.	Bindung von Hexobendin	
3.2.1.2.	Einfluß von Reserpin auf die Proteinbindung von Hexobendin	13
3.2.2.	Untersuchung der Spaltung unter weitgehender Ausschaltung des Einflusses der Bindung an enzymatisch inaktive Proteine	15
3.2.2.1.	Spaltung von Hexobendin in verdünntem Meerschweinchenplasma	
3.2.2.2.	Spaltung von Hexobendin in verdünntem Meerschweinchenplasma unter Zusatz von Reserpin	16
3.2.3.	Bindung und Spaltung von Hexobendin in unverdünntem Meerschweinchenplasma	20
3.2.3.1.	Diskussion der Ergebnisse von Abschnitt 3.1.1.2.	
3.2.3.2.	Einfluß von Reserpin auf die gleichzeitige Bindung und Spaltung von Hexobendin	21

3.2.3.3. Verhalten der Hexobendinspaltprodukte in Abhängigkeit von der Hexobendinkonzentration und vom Zusatz von Reserpin 22

3.3. Beschreibung des untersuchten Systems 25

4. LITERATURÜBERSICHT, BESPRECHUNG DER BEFUNDE UND AUSWERTUNGSVERFAHREN 27

4.1. Plasmaproteinbindung 28

4.1.1. Ausmaß der Bindung

4.1.2. Art der Bindung 29

4.1.3. Kompetitionseffekte bei Vorhandensein mehrerer Substanzen 32

4.1.4. Graphische Darstellung und mathematische Formulierung der Plasmaproteinbindung (Auswertungsverfahren) 35

4.1.4.1. Bindungsstellen gleicher Affinität

4.1.4.2. Bindungsstellen verschiedener Affinität 40

4.1.4.3. Freundlich'sche Adsorptionsisotherme 41

4.1.4.4. Kompetition mehrerer Substanzen um gleiche Bindungsstellen 45

4.1.4.5. Einfluß einer Plasmaverdünnung auf die Bindung einer Substanz 47

4.1.5. Pharmakologische Bedeutung der Plasmaproteinbindung von Pharmaka 50

4.1.5.1. Wirksamkeit

4.1.5.2. Verteilung, Penetration 51

4.1.5.3. Elimination, Filtration und Metabolisierung 52

4.2. Enzymatische Esterspaltung 54

4.2.1. Art des Enzyms

4.2.2. Enzymkinetik

4.2.2.1. Michaelis-Menten-Theorie

4.2.2.2. Spaltung von Hexobendin 56

4.3. Bindung und Spaltung 57

5. METHODISCHER TEIL 60

5.1. Plasmaproteinbindung

5.1.1. Experimentelle Bestimmung

5.1.2. Berechnung 62

5.1.3. Kritische Betrachtung der modifizierten Sephadex-Gelfiltration 64

5.2. Esterspaltung von Hexobendin 66

5.3. Chromatographische Bestimmung von Hexobendin und seinen Spaltprodukten 67

5.4. Radiometrische Bestimmung

5.5. Verwendete Substanzen 68

6. LITERATUR 69

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die Bindung von Hexobendin an enzymatisch inaktive Proteine des Meerschweinchenplasmas wurde untersucht. Um den Einfluß der gleichzeitig ablaufenden esteratischen Spaltung von Hexobendin weitgehend auszuschalten, wurde die Gelfiltrationsmethode zur Bestimmung der Plasmaproteinbindung modifiziert. Damit konnte die Eiweißbindung von Hexobendin innerhalb weniger Minuten bestimmt werden.

Hexobendin ist im Meerschweinchenplasma bei einer Konzentration von 1 µg/ml zu 90 % an Plasmaproteine gebunden. Diese Bindung wird durch Erhöhung der Hexobendinkonzentration, ebenso durch Zusatz von Reserpin wie auch durch Erniedrigung der Plasmaproteinkonzentration stark vermindert.

An diesen Beispielen werden Theorie und Auswertungsverfahren der Plasmaeiweißbindung besprochen und auf die gefundenen Werte angewendet. Pharmakologische Konsequenzen werden angeführt, die sich aus der Erniedrigung der freien Konzentration einer Substanz durch die Bindung an Plasmaproteine ergeben.

Für die Spaltung von Hexobendin, die in verdünntem Meerschweinchenplasma verfolgt wurde, wurde eine Michaelis-Konstante Km = 7.10^{-5} M/l und bei Zugabe des kompetitiven Inhibitors Reserpin ein Ki-Wert von 2.10^{-5} M/l gefunden.

Bei gleichzeitiger Bindung und Spaltung von Hexobendin im Meerschweinchenplasma nahm bei niedriger Konzentration die Spaltung bei Erhöhung der Substratkonzentration über ein der Konzentrationsänderung proportionales Maß hinaus zu. Dieser Befund wird erklärt, daß durch Verminderung des an Proteine gebundenen Hexobendinanteils bei Konzentrationserhöhung relativ mehr freies Hexobendin dem enzymatischen Angriff zur Verfügung steht.

Ebenso wird durch Reserpin proteingebundenes Hexobendin freigesetzt und trotz Anwesenheit des inhibitorisch wirksamen Reserpins eine Zunahme der Spaltung beobachtet. Erst bei höheren Hexobendinkonzentrationen zeigt sich die Hemmwirkung

des Reserpins auf die Hexobendinspaltung.

Diese konzentrationsabhängige Einflußnahme der Plasmaproteinbindung auf die Metabolisierungsrate einer Substanz wird im Hinblick auf ihre Bedeutung in vivo diskutiert.

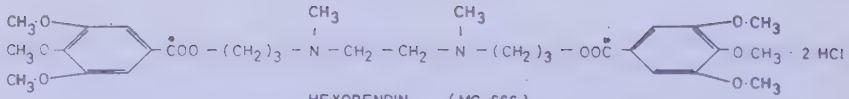
2. EINLEITUNG

Bei der Untersuchung der Aufnahme des Coronardilatators Hexobendin (65,87) in das isolierte Meerschweinchenherz wurde der Einfluß der Plasmaproteinbindung auf die aufgenommene Menge nachgewiesen (85).

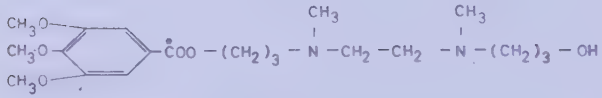
Hexobendin ist ein Ester zwischen der Trimethoxybenzoesäure und dem Aminoalkohol N,N'-Dimethyl-N,N'-bispropanol-äthylendiamin (Abb.1). Diese Esterbindung kann durch Plasmaesterasen gespalten werden. Von den untersuchten Spezies war die enzymatische Aktivität der Hexobendinspaltung im Meerschweinchenplasma am höchsten (128).

Gegenstand der vorliegenden Arbeit sollte es sein, den Einfluß der Plasmaproteinbindung auf die Spaltung von Hexobendin zu prüfen: Hexobendin wird im Meerschweinchenplasma an enzymatisch inaktive Plasmaproteine gebunden und durch enzymatisch aktive Plasmaproteine gespalten.

Es wurde von der Situation ausgegangen, wie sie ohne äußere Einflußnahme im Meerschweinchenplasma bei gleichzeitiger Bindung und Spaltung von Hexobendin gefunden wurde. Anschließend wurde die Bindung unter weitgehendster Ausschaltung der Spaltung und ebenso die Spaltung unter weitgehendster Ausschaltung der Bindung von Hexobendin untersucht. Diese beiden Phänomene wurden dann herangezogen, um den eingangs vorgestellten Befund zu erklären und damit die tatsächlich vorhandenen Verhältnisse im Meerschweinchenplasma aufzuzeigen.

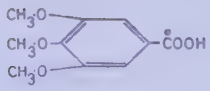


HEXOBENDIN (MG 666)



„Halbester"

Ċ - radioaktives ^{14}C



Trimethoxybenzoesäure

Abb.1: Strukturformeln von Hexobendin und seinen Spaltprodukten

"Halbester" = halbseitig hydrolysiertes Hexobendin

3. EXPERIMENTELLER TEIL UND BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

3.1. BEFUNDE, DIE ZUR FORMULIERUNG DER PROBLEMSTELLUNG FÜHRTEN

3.1.1. Ergebnisse

3.1.1.1. Zeitlicher Verlauf der Spaltung von Hexobendin im Meerschweinchenplasma

Die Spaltung von Hexobendin im Plasma des Meerschweinchens wurde bei einer Ausgangskonzentration von 1 µg/ml während 60 Minuten bei 37°C beobachtet. Zu verschiedenen Zeiten wurde die Verteilung der eingesetzten ^{14}C-Aktivität auf das unveränderte Hexobendin und seine Spaltprodukte, welche bei esteratischem Abbau entstehen, bestimmt. Das experimentelle Vorgehen ist im methodischen Teil beschrieben (Abschnitt 5.2.), die Ergebnisse in Abb.2 dargestellt.

Nach 3 Minuten liegen 35 % des angebotenen ^{14}C-Hexobendins noch unverändert vor, während 32 % als Halbester und 33 % als Trimethoxybenzoesäure mit ^{14}C markiert auftreten. Der Anteil an Trimethoxybenzoesäure steigt weiter an, bis er nach 60 Minuten 92 % der ^{14}C-Gesamtaktivität bildet. Der Halbester nimmt nur bis zur 10. Minute zu, um dann bis zur 60. Minute wieder kontinuierlich abzufallen.

Da Hexobendin ein Diester der Trimethoxybenzoesäure ist, kann das Enzym an zwei Seiten des Moleküls angreifen (Abb.1). Wenn vom intakten Hexobendinmolekül ein Trimethoxybenzoesäurerest abgespalten wird, dann bildet das halbseitig hydrolysierte Hexobendin, das im weiteren als "Halbester" bezeichnet werden soll, ein weiteres Substrat für das Enzym. Nur so läßt sich der Befund erklären, dass der Anteil des Halbesters an der gesamte ^{14}C-Aktivität durch die Spaltung von Hexobendin zuerst ansteigt später jedoch wieder abfällt, weil er selbst einer Esterspaltung anheimfällt.

Der Vergleich der Spaltungsgeschwindigkeit des Enzyms im Meerschweinchenplasma für die beiden Substrate, Hexobendin

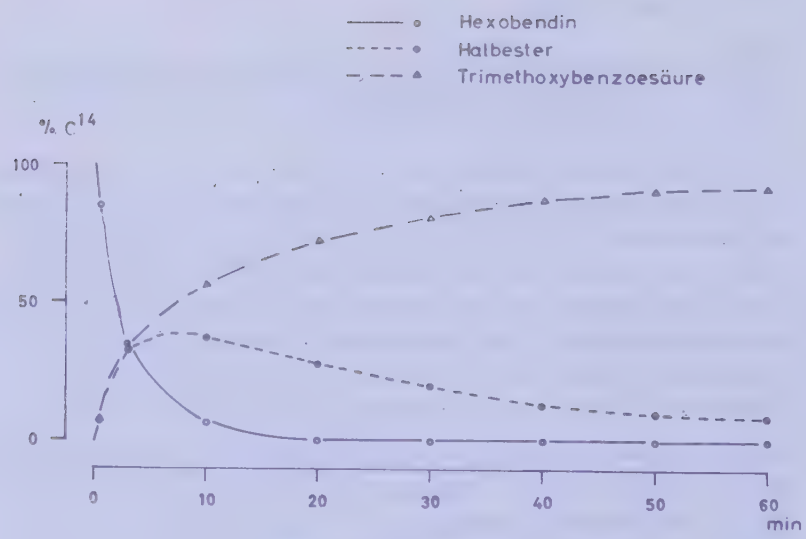


Abb.2: Zeitlicher Verlauf der Spaltung von Hexobendin im Meerschweinchenplasma

Verteilung der ^{14}C-Aktivität auf Hexobendin und seine Spaltprodukte in Prozenten des zugesetzten ^{14}C-Hexobendins.

Mittelwerte von jeweils 4 Einzelbestimmungen.

und Halbester, fällt eindeutig zugunsten des unveränderten Hexobendinmoleküls aus. Vergleicht man ungefähr gleiche Anfangskonzentrationen, so findet man, daß von den 0,35 µg/ml Hexobendin, eine nach 3 Minuten erreichte Konzentration, die Hälfte nach weiteren 3 Minuten gespalten ist. Die zum Zeitpunkt 10 Minuten vorhandenen 0,37 µg/ml Halbester sind erst nach weiteren 22 Minuten auf die Hälfte abgesunken (Abb.2). Die Spaltung des im Vergleich zu Hexobendin polareren Halbesters verläuft also wesentlich langsamer.

3.1.1.2. Spaltung von Hexobendin im Meerschweinchenplasma bei verschiedenen Konzentrationen

Die Spaltung von Hexobendin im Meerschweinchenplasma wurde bei Angebot verschiedener Anfangskonzentrationen nach dem im Abschnitt 5.2. näher beschriebenen Verfahren untersucht. Dabei wurde das Ausmaß der Spaltung nach 3 Minuten (vergleiche Abb.2) bei Angebot von 1, 10 und 100 µg/ml Hexobendin bestimmt. Der Anteil des noch unveränderten Hexobendins wurde in Prozenten der angebotenen Menge in Abb.3a eingezeichnet. Nach 3 Minuten waren bei dem Angebot von 1 µg/ml Hexobendin noch 38 % unverändert, während nach dem gleichen Zeitraum bei den Ausgangskonzentrationen von 10 und 100 µg/ml nur noch 8,5 bzw. 10 % nicht gespalten waren. Bei höheren Hexobendinkonzentrationen wurde also nicht nur absolut sondern auch prozentual mehr gespalten als bei dem niedrigsten Angebot.

Bei Betrachtung absoluter Mengen nimmt die Umsatzgeschwindigkeit eines Enzyms im klassischen Fall (reines Enzym, keine störenden Einflüsse, Verhalten nach der Michaelis-Menten-Theorie (11,40,66,84,123))höchstens proportional der Erhöhung der Substratkonzentration zu, wenn weit unterhalb der Enzymsättigung gearbeitet wird. Dabei würde das prozentuell umgesetzte Menge ungefähr gleichbleiben. Bei steigender Konzentration strebt die Umsatzgeschwindigkeit einem Maximalwert zu. Das würde zu einer Erhöhung der prozentuell unveränderten Substanz führen.

Im vorliegenden Fall ergibt sich somit eine deutliche Abweichung vom eben beschriebenen, erwarteten Verhalten: Die

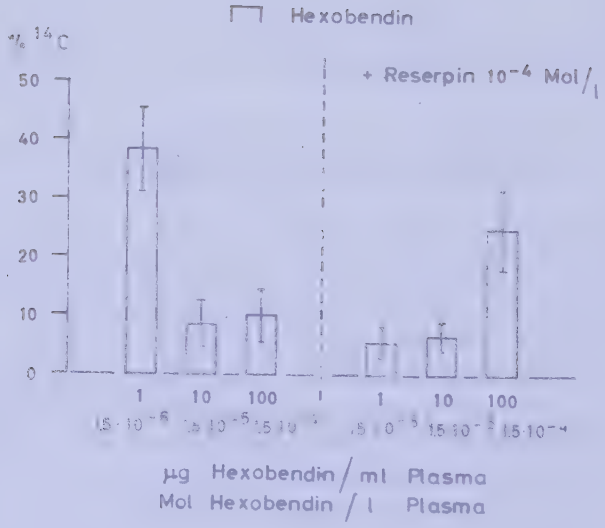


Abb. 3a: Hexobendinspaltung bei verschiedenen Substratkonzentrationen

Abb. 3b: unter Zusatz von 10^{-4} M/l Reserpin

Angegeben ist das unveränderte Hexobendin nach 3 min Inkubation in Prozenten des zugesetzten Hexobendins.

Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 6 Einzelbestimmungen.

wiedergefundene Substratmenge ist bei höherer Konzentration prozentual niedriger. Die Umsatzgeschwindigkeit der enzymatischen Spaltung von Hexobendin im Meerschweinchenplasma steigt über eine einfach proportionale Zunahme hinaus an, was vorerst als eine scheinbare "Enzymaktivierung" durch das Substrat (4C) bezeichnet werden soll.

5.1.2. Theoretische Überlegungen

Worauf kann die Abweichung der Hexobendinspaltung im Meerschweinchenplasma vom erwarteten Verhalten beruhen? Bei Beantwortung dieser Frage empfiehlt es sich, bevor allfällige enzymatische Enzymeigenschaften (111) zur Erklärung herangezogen werden, zuerst eine Betrachtung der vorgegebenen Verhältnisse anzustellen. Im Meerschweinchenplasma muß damit gerechnet werden, daß

a) im einfachsten Fall neben dem Substrat, in unserem Fall Hexobendin, und dem enzymatisch aktiven Protein noch zumindest ein enzymatisch inaktives Protein vorhanden ist, das die Fähigkeit besitzt, Hexobendin zu binden, ohne es zu spalten. Mit einer Bindung verschiedenen Ausmaßes eines Arzneimittels an enzymatisch inaktive Eiweißkörper des Plasmas, ist in allen Fällen zu rechnen (57,119).

b) Dieses Modell stellt jedoch noch immer eine Vereinfachung der wirklichen Verhältnisse dar. Da das Plasma verschiedene Enzyme enthält, die eine esteratische Aktivität aufweisen (3,9,64,121,129), ist die Möglichkeit gegeben, daß Hexobendin nicht von einem einheitlichen Enzymprotein gespalten wird, sondern daß verschiedene Proteine des Meerschweinchenplasmas in der Lage sind, Hexobendin zu spalten, wenn auch mit verschiedener Affinität.

Ebenso ist bekannt, daß im Plasma verschiedene enzymatisch inaktive Eiweißkörper vorhanden sind, die die Fähigkeit besitzen, Arzneimittel reversibel zu binden (57,150). Deshalb muß auch im vorliegenden Fall in Betracht gezogen werden, daß es sich bei den Hexobendin-bindenden Plasmaeiweißkörpern nicht um eine einheitliche Fraktion handelt,

sondern daß verschiedenartige Proteine Hexobendin mit verschiedener Affinität binden.

c) Doch nicht nur das Enzymsystem im Meerschweinchenplasma, welches Hexobendin spaltet, und die enzymatisch inaktive Proteinfraktion, welche Hexobendin bindet, sind möglicherweise uneinheitlich. Auch das Substrat der Spaltung einerseits und Bindung andererseits besteht nicht nur aus dem angebotenen Hexobendin. Wie schon vorher ausgeführt (Abschnitt 3.1.1.1.) stellt der bei esteratischem Abbau von Hexobendin entstehende Halbester ebenso ein Substrat für die Esterasen des Meerschweinchenplasmas dar. Die Umsatzgeschwindigkeit der beiden Substrate weicht jedoch stark voneinander ab.

d) Reserpin ist wie Hexobendin ein Ester der Trimethoxybenzoesäure. Geht man von der Annahme aus , daß der aromatische Ring der Trimethoxybenzoesäure bei der Bindung an Enzymproteine und enzymatisch inaktive Proteine eine wesentliche Rolle spielt (Abschnitt 4.1.2.), wäre es möglich, daß Reserpin einer im Vergleich zu Hexobendin ähnlichen Bindung und Spaltung im Meerschweinchenplasma unterliegt. Der Einfluß von Reserpin wurde deshalb bei den folgenden Experimenten mituntersucht.

Aus den beschriebenen möglichen Verhältnissen im Plasma des Meerschweinchens bei der Bindung und Spaltung von Hexobendin wurde folgende Problemstellung abgeleitet:

Untersuchung der

1) Bindung ohne Einfluß der Spaltung
   a) von Hexobendin selbst
   b) unter dem Einfluß von Reserpin

2) Spaltung ohne Einfluß von enzymatisch inaktiven Proteinen
   a) von Hexobendin selbst
   b) unter dem Einfluß von Reserpin

3) und der Verhältnisse bei gemeinsamen Auftreten von Bindung und Spaltung.

3.2. [illegible] HEXOBENDIN IM MEERSCHWEINCHENPLASMA

3.2.1. Untersuchung der Proteinbindung unter weitgehender Ausschaltung des Einflusses der Spaltung

3.2.1.1. Bindung von Hexobendin

Die Bindung von Hexobendin an die Eiweißkörper des Meerschweinchenplasmas bei steigender Konzentration wurde mit der im methodischen Anhang beschriebenen Membrandialyse untersucht (Abschnitt 5.1.). Durch Modifikation der herkömmlichen Methode war es möglich, 1% Antibiotika nach Zugabe von Hexobendin durch Zentrifugation Plasmawasser zur Bestimmung der freien Konzentration abzutrennen. Bei einer Gesamtkonzentration von 1 µg/ml Hexobendin wurden unter diesen Bedingungen höchstens 5–10 % im Meerschweinchenplasma gespalten. Damit wurde der Einfluß der Spaltung auf die Bindungsverhältnisse weitgehend ausgeschaltet und wurde bei den folgenden Ergebnissen vernachlässigt.

Die Abb.4 zeigt die Resultate. Auf der Abszisse sind die jeweils eingesetzten Hexobendin-Gesamtkonzentrationen im logarithmischen Maßstab aufgetragen. Die Ordinate gibt in Prozenten auf der linken Seite der Abbildung den proteingebundenen Anteil und gegenläufig dazu auf der rechten Seite den freien Anteil an der Gesamtkonzentration an.

Man findet bei 0,5 µg/ml eine Eiweißbindung von über 90 %. Bei Erhöhung der Hexobendinkonzentration wird der gebundene Anteil kleiner, sodaß bei 5 mg/ml nur noch ca 10 % proteingebunden vorliegen.

Bei therapeutischer Dosierung von Hexobendin wird ungefähr ein Blutspiegel in der Größenordnung von 0,1 µg/ml erreicht (128), entsprechend einer molaren Konzentration von $1,5.10^{-7}$. Bei dieser Hexobendinkonzentration liegen jedoch über 90 % an Plasmaproteine gebunden vor. Die für die spezifische Wirkung verantwortliche freie Konzentration von Hexobendin ist demnach ungefähr ein Zehntel des gemessenen Gesamtblutspiegels und beträgt ca 10^{-8} Mol/l. Wie Versuche am isolierten

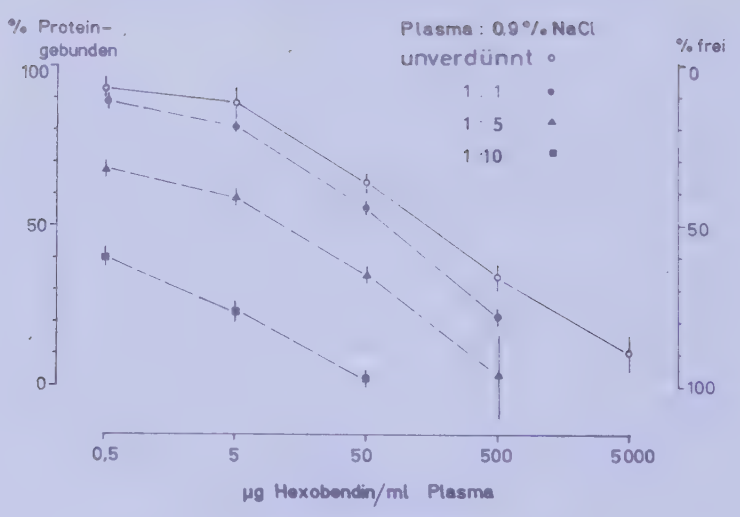


Abb.4: Proteinbindung von Hexobendin in unverdünntem und verdünntem Meerschweinchenplasma

Die proteingebundene und gegenläufig die freie Hexobendinmenge pro ml Plasma in Prozent der Gesamtkonzentration sind gegen die Hexobendingesamtkonzentration (Abszisse: logarithmisch) aufgetragen.

Der Grad der Verdünnung ist durch verschiedene Symbole gekennzeichnet.

Mittelwerte und Standarabweichungen von jeweils 4 Einzelbestimmungen.

Herzen gezeigt haben, reicht aber eine Konzentration von 10^{-8} Mol/l völlig zur Potenzierung der Adenosinwirkung aus, was zur Erklärung der coronare weitenden Wirkung von Hexobendin herangezogen wird (127).

Das Bestehen eines Gleichgewichtes zwischen gebundener und freier Substanz zeigt das Verhalten der Proteinbindung von Hexobendin bei Verdünnung des Meerschweinchenplasmas. Der proteingebundene Anteil nimmt bei Erniedrigung der Proteinkonzentration durch Verdünnung des Plasmas ab. Die untersuchten Verdünnungen sind durch verschiedene Symbole in der Abb.4 dargestellt. Die Abnahme der Eiweißbindung gegenüber unverdünntem Plasma beträgt bei einer 1:1 Verdünnung 5–10 %, bei 1:5 ca 30 % und bei 1:10 ca 60 %. Die Kurven, welche die Beziehung zwischen proteingebundenem bzw. freiem Anteil und der Hexobendin-Gesamtkonzentration wiedergeben, zeigen dabei einen nahezu parallelen Verlauf. Das heißt, daß sich die Verdünnung des Plasmas auf jeder Stufe der verschiedenen Hexobendinkonzentrationen prozentual gleich auswirkt.

3.2.1.2. Einfluß von Reserpin auf die Proteinbindung von Hexobendin

Die Eiweißbindung von Hexobendin in unverdünntem Meerschweinchenplasma wird durch den Zusatz von 10^{-4} M/l Reserpin deutlich verringert (Abb.5). Dabei sinkt der proteingebundene Anteil bei einer Hexobendin-Gesamtkonzentration von 1 µg/ml (= $1{,}5.10^{-6}$ M/l) von 90 % auf 60 %. Die Erniedrigung des gebundenen Anteils beträgt bei 10 µg/ml Hexobendin 20 % und bei 100 µg/ml 10 %.

Im Gegensatz zum vorher beschriebenen Einfluß einer Verdünnung des Meerschweinchenplasmas wirkt sich der Zusatz von Reserpin auf die Proteinbindung von Hexobendin nicht bei jeder Hexobendinkonzentration gleich aus. Die Verminderung der Plasmaeiweißbindung von Hexobendin durch Zugabe von 10^{-4} M/l Reserpin ist bei der niedrigsten Hexobendinkonzentration mit 30 % am größten und wird mit Erhöhung der Hexobendinkonzentration zunehmend geringer, bis sie bei

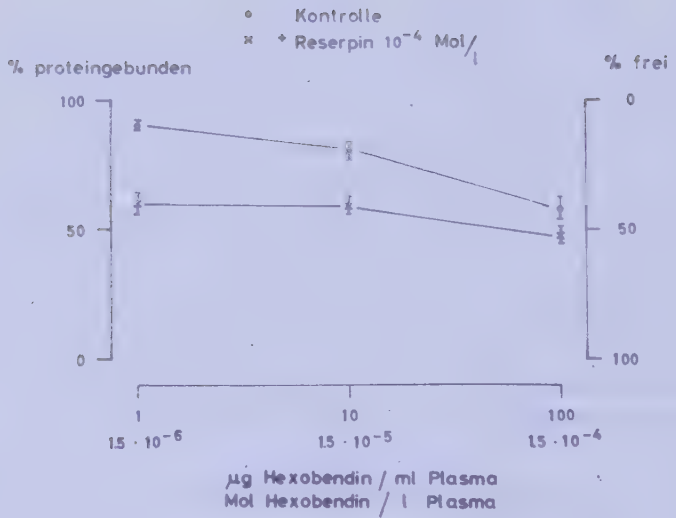


Abb.5: Proteinbindung von Hexobendin im Meerschweinchenplasma in Anwesenheit von 10^{-4} M/l Reserpin

Die proteingebundene und gegenläufig die freie Hexobendinmenge pro ml Plasma in Prozent der Gesamtkonzentration sind gegen die Hexobendingesamtkonzentration (Abszisse: logarithmisch) aufgetragen.

Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 5 Einzelbestimmungen.

einer Konzentration von 100 µg/ml Hexobendin nur noch 10 % beträgt. Die Bindungskurven verlaufen nicht parallel wie in Abb.4, sondern sie konvergieren in Abb.5. Es kommt bei einem erhöhten Angebot von Hexobendin allein zu einem steileren Absinken des gebundenen Anteils, als bei steigender Hexobendinkonzentration unter Zusatz einer gleichbleibenden Menge Reserpin.

Während es bei der Erniedrigung der Proteinkonzentration durch Verdünnung des Plasmas zu einer absoluten Verringerung der möglichen Bindungsstellen kommt, werden durch Reserpin ein Teil der Bindungsplätze reversibel besetzt, wobei die Affinität der Eiweißkörper zu den beiden angebotenen Substanzen, Hexobendin und Reserpin, und die vorliegenden Substanskonzentrationen ausschlaggebnd sind für die Bindungsverhältnisse.

Vergleicht man das Bindungsausmaß der beiden Substansen, Hexobendin und Reserpin, dann findet man eine ziemliche Übereinstimmung: Bei einer Reserpinkonzentration von 10^{-4} M/l werden von einer geringen, die Bindung von Reserpin kaum beeinflussenden Hexobendinkonzentration von $1,5.10^{-6}$ M/l 60 % an Proteine gebunden. Nimmt man an, daß Hexobendin und Reserpin größtenteils durch gleiche Bindungsstellen gebunden werden, gibt diese Hexobendinkonzentration annähernd das Bindungsausmaß von Reserpin wieder. In dem Fall, wo Hexobendin allein in einer Konzentration von $1,5.10^{-4}$ vorliegt, beträgt der eiweißgebundene Anteil 58 % (Abb.5).

3.2.2. Untersuchung der Spaltung unter weitgehender Ausschaltung des Einflusses der Bindung an enzymatisch inaktive Proteine

3.2.2.1. Spaltung von Hexobendin in verdünntem Meerschweinchenplasma

Um die enzymatis he Spaltung beschreiben zu können, ist es notwendig im Bereich der Sättigung des Enzyms zu arbeiten. So wird eine Anfangsgeschwindigkeit erreicht, die kaum mehr

als Änderung der Substratkonzentration variiert, sondern als Umsatzgeschwindigkeit eine Funktion erstens der Affinität des Enzyms zu dem Substrat und zweitens der Enzymmenge ist (11,40,66,84,123). Bei der Spaltung von Hexobendin im Meerschweinchenplasma konnte in einem Konzentrationsbereich von 10-100 µg/ml Hexobendin eine annähernd konstante Umsatzgeschwindigkeit durch eine 1:100 Verdünnung des Plasmas erreicht werden.

Wie die vorausgegangene Untersuchung der Bindung von Hexobendin und des Einflusses einer Verdünnung des Plasmas zeigt, ist im Konzentrationsbereich von 10-100 µg/ml Hexobendin nach einer 1:10 Verdünnung höchstens noch mit einem Anteilseinbau von 2 % zu rechnen. Damit kann der Einfluß der Bindung an enzymatisch inaktive Plasmaeiweißkörper durch die hier vorgenommene 1:100 Verdünnung des Plasmas vernachlässigt werden. Denn die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes ist nur aus dem frei verfügbaren Substrat möglich (Abschnitt 4.3.).

Die gefundenen Werte für die Spaltung von Hexobendin ergeben in einem Lineweaver-Burk-Diagramm (Abschnitt 4.2.2.) eine Gerade (Abb.4), aus der sich die Michaelis-Konstante und die maximale Anfangsgeschwindigkeit der enzymatisch katalysierten Reaktion ablesen lassen (11,40,66,84,123). Die statistische Berechnung dazu findet sich in der Tab.1a. Der K_M-Wert beträgt $7 \cdot 10^{-5}$ M/l. Die maximale Spaltungsgeschwindigkeit beträgt nach Umrechnung auf unverdünntes Plasma theoretisch, ohne Berücksichtigung der gleichzeitigen Bindung an enzymatisch inaktive Proteine $4{,}2 \cdot 10^{-4}$ M/l (Tab.1b).

4.2.2.2. Spaltung von Hexobendin im verdünnten Meerschweinchenplasma unter Zusatz von Reserpin

Bei gleichem Vorgehen wie im vorangegangenen Abschnitt wurde die Spaltung von Hexobendin unter Zusatz von 10^{-5} M/l Reserpin untersucht. Die Ergebnisse wurden in das gleiche Diagramm eingezeichnet und ergaben wiederum eine Gerade (Abb.4). Die berechneten Regressionsgeraden sind in der Tab.1a und b wiedergegeben.

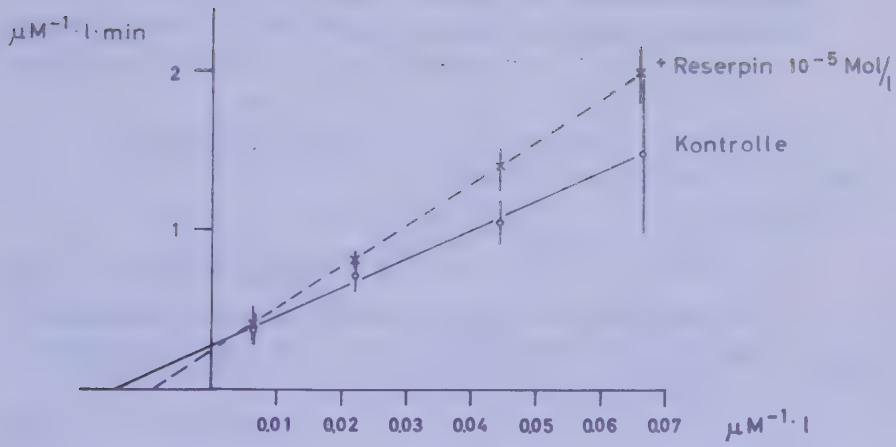


Abb.6: Spaltung von Hexobendin in verdünntem Meerschweinchenplasma

Lineweaver-Burk-Diagramm: Berechnung siehe Tab.1a.

Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 3 Einzelbestimmungen

Tab.1a: Spaltung von Hexobendin im Meerschweinchenplasma

Verdünnung des Plasmas 1:100
pH 7,4, 37°C
Verwendete Einheiten: µMol, l, min

1/v - 1/S - Auftragung (Lineweaver-Burk-Diagramm):

Kontrolle	$1/v = 18,17.1/S + 0,27$
+ Reserpin 10^{-5} M/l	$1/v = 26,38.1/S + 0,25$

Die Differenz der Regressionskoeffizienten (Km/Vmax) ist mit $F = 5,617$ ($n_1=1$, $n_2=20$, $p<0,05$) signifikant.

S/v - S - Auftragung (Eadie-Diagramm):

Kontrolle	$S/v = 0,25.S + 19,14$
+ Reserpin 10^{-5} M/l	$S/v = 0,23.S + 26,22$

Die Differenz der Regressionskoeffizienten (1/Vmax) ist mit $F = 0,037$ ($n_1=1$, $n_2=20$, $p>0,05$) nicht signifikant. Als gemeinsamer Regressionskoeffizient kann $b = 0,24$ errechnet werden (113).

Tab.1b: Spaltung von Hexobendin im Meerschweinchenplasma

Theoretische Spaltungswerte nach Umrechnung auf unverdünntes Plasma (Außerachtlassen der Bindung von Hexobendin an enzymatisch inaktive Proteine)
Verwendete Einheiten: Mol, l, min

	V_{max} ($M.l^{-1}.min^{-1}$)	Km bzw. Kp ($M.l^{-1}$)	Ki
1/v - 1/S - Auftragung			
Kontrolle	$3,7.10^{-4}$	$6,7.10^{-5}$	
+ Reserpin 10^{-5} M/l	$4,4.10^{-4}$	$11,5.10^{-5}$	$1,4.10^{-5}$
S/v - S - Auftragung			
Kontrolle	$4,1.10^{-4}$	$7,8.10^{-5}$	
+ Reserpin 10^{-5} M/l	$4,3.10^{-4}$	$11,4.10^{-5}$	$2,3.10^{-5}$

Die Gerade für die Spaltung von Hexobendin allein schneidet die Ordinate an ungefähr dem gleichen Punkt wie die Gerade, die für die Spaltung von Hexobendin unter gleichzeitiger Anwesenheit von Reserpin gewonnen wurde. Die Steigungen der beiden Geraden unterscheiden sich jedoch signifikant voneinander (Tab.1a).

Der Abschnitt auf der Ordinate des Lineweaver-Burk-Diagramms hat den Wert 1/Vmax, die Steigung der Geraden den Wert Km/Vmax. Damit läßt sich ablesen, daß die maximale Spaltungsgeschwindigkeit von Hexobendin durch die Esterasen des Meerschweinchenplasmas unabhängig von der Anwesenheit von Reserpin ist. Der Unterschied der Steigungen der beiden Geraden beruht auf einer Verschiedenheit von Km. Demnach ist Reserpin ein kompetitiver Inhibitor (11,40,66,84,123).

3.2.3. Bindung und Spaltung von Hexobendin im unverdünnten Meerschweinchenplasma

3.2.3.1. Diskussion der Ergebnisse von Abschnitt 3.1.1.2.

Die Befunde von Abschnitt 3.1.1.2. lassen sich nun folgendermaßen erklären: Ein Vergleich mit dem Km-Wert (Tab.1b) zeigt, daß die verwendete freie Hexobendinkonzentration nicht für eine Sättigung des Enzymsystems ausreicht. Unter diesen Bedingungen hängt die Umsatzgeschwindigkeit bei gleicher Enzymmenge und -affinität nur von der Substratkonzentration ab.

Wie aus den Bindungsexperimenten (Abschnitt 3.2.1.1.) hervorgeht, nimmt die Menge an freiem Hexobendin mit der Erhöhung der Gesamtkonzentration nicht proportional zu. Die Zunahme ist vielmehr größer; bei einer Erhöhung der Gesamtkonzentration von 1 µg/ml um den Faktor 10 auf 10 µg/ml Hexobendin steigt die freie Konzentration von 0,095 µg/ml auf 1,9 µg/ml Hexobendin, also um den Faktor 20 (Abb.5).

Damit steht aber der enzymatischen Spaltung eine weit höhere freie Konzentration zur Verfügung, als der Erhöhung der Gesamtkonzentration entsprechen würde. Wenn nun das Enzymsystem weit von seiner Sättigung entfernt ist, steigt die

Umsatzgeschwindigkeit über das nach der Erhöhung der Gesamtkonzentration erwartete Maß an, da sie in diesem Fall eine Funktion der freien Substratkonzentration ist. Bei einer Erhöhung der Hexobendingesamtkonzentration von 1 µg/ml auf 10 µg/ml kommt es deshalb zu einer prozentuslen Zunahme des nach 3 Minuten gespaltenen Hexobendins bei einer Zunahme der absolut gespaltenen Menge um den Faktor 15 (Abb.3a). Eine genaue Proportionalität zwischen Erhöhung der freien Konzentration (Faktor 20) und Zunahme der absolut gespaltenen Hexobendinmenge (Faktor 15) wird nicht gefunden, weil einerseits die Umsatzgeschwindigkeit nicht linear mit der Substratkonzentration zunimmt (Abschnitt 4.2.2.) und andererseits die freie Konzentration während der Spaltung rascher abnimmt, als der gespaltenen Menge entspricht, da bei Absinken der Konzentration die Bindung an enzymatisch inaktive Plasmaproteine wieder zunimmt (Abschnitt 3.2.1.1.).

Gelangt man hingegen in den Bereich der Sättigung des Enzyms, dann kann auch die überhöhte Zunahme der freien Konzentration nicht mehr zu einer weiteren Erhöhung der Umsatzgeschwindigkeit führen, da eine für die Enzymmenge und -affinität charakteristische Maximalgeschwindigkeit assymptotisch erreicht wird. Bei einer Gesamtkonzentration von 100 µg/ml Hexobendin im Meerschweinchenplasma wird die beginnende Sättigung des Enzyms angedeutet:

Im Vergleich zu den Verhältnissen bei einer Gesamtkonzentration von 10 µg/ml hat die freie Konzentration um den Faktor 22 zugenommen (Abb.5). Die absolut gespaltene Hexobendinmenge ist aber nur um weniger als den Faktor 10 höher und bleibt damit sogar schon unter der Erhöhung der Gesamtkonzentration. Diese Tatsache führt zu einer geringen Zunahme des prozentuellen Anteils an unverändert wiedergefundenem Hexobendin (Abb.3a).

3.2.3.2. Einfluß von Reserpin auf die gleichzeitige Bindung und Spaltung von Hexobendin

Setzt man bei gleichen Versuchsbedingungen (Abschnitt 5.2.) 10^{-4} M/l Reserpin zu, so erhält man die in Abb.3b wiedergegebenen Ergebnisse. Die prozentuell gespaltene Menge ist

bei der niedrigsten Konzentration von 1 µg/ml Hexobendin am größten. Bei höheren Konzentrationen wird prozentuell immer mehr unverändertes Hexobendin wiedergefunden.

Wie in Abschnitt 3.2.1.2. und 3.2.2.2. beschrieben wurde, besitzt Reserpin sowohl einen Einfluß auf die Bindung als auch auf die Spaltung von Hexobendin im Meerschweinchenplasma: Einerseits erhöht Reserpin die freie Hexobendinkonzentration und ist somit in der Lage, dessen Spaltung indirekt zu beschleunigen. Andererseits ist Reserpin für die Spaltung von Hexobendin ein kompetitiver Inhibitor.

Diese beiden gegensätzlichen Effekte werden je nach Hexobendinkonzentration sichtbar. Bei niedriger Konzentration (1 µg/ml Hexobendin) überwiegt die Zunahme der Spaltung auf Grund der Erhöhung der freien Hexobendinkonzentration. Der prozentuelle Anteil an unverändertem Hexobendin nimmt gegenüber dem Kontrollfall signifikant ab (Abb.3a und b).

Bei höherer Konzentration (10 µg/ml Hexobendin) wird die freie Konzentration durch Reserpin nur geringfügig erhöht. Die Herabsetzung der Spaltungsgeschwindigkeit durch den Inhibitor Reserpin fällt nun stärker ins Gewicht und führt zu einer signifikanten Zunahme des prozentuellen Anteils an noch unverändert wiedergefundenem Hexobendin (Abb.3a und b).

3.2.3.3. Verhalten der Hexobendinspaltprodukte in Abhängigkeit von der Hexobendinkonzentration und vom Zusatz von Reserpin

Bei den Versuchen von Abschnitt 3.1.1.2. und 3.2.2.2. wurde auch die Verteilung der als ^{14}C-Hexobendin eingesetzten Radioaktivität auf die beiden Spaltprodukte, Trimethoxybenzoesäure und Halbester, gemessen. Dabei ergibt sich folgendes Bild (Abb.7): Ohne Reserpinzusatz ist die gefundene Menge an ^{14}C-Trimethoxybenzoesäure bei allen angebotenen Hexobendinkonzentrationen höher als die entsprechenden Mengen ^{14}C-Halbester. Der schon in Abschnitt 3.1.1.1. erhobene Befund, daß der Halbester ebenso ein Substrat für die Esterasen des Meerschweinchenplasmas darstellt, erfährt dadurch eine neuerliche Bestätigung.

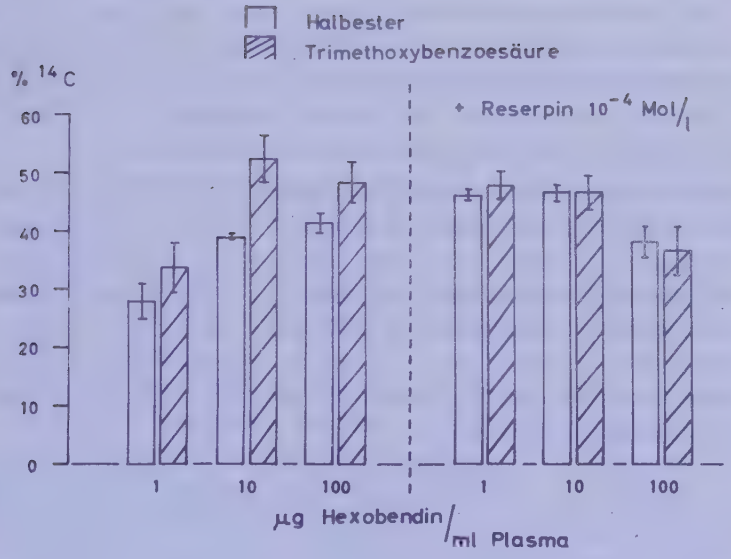


Abb.7: Spaltprodukte von Hexobendin nach 3 min Inkubation in Meerschweinchenplasma

^{14}C-Halbester und ^{14}C-Trimethoxybenzoesäure in Prozenten des zugesetzten ^{14}C-Hexobendins.

Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 6 Einzelbestimmungen.

wenn der Halbester im Meerschweinchenplasma nicht einer Spaltung unterliegen würde, müßte also die ^{14}C-Aktivität nach Spaltung des angebotenen Hexobendins auf beide Spaltprodukte gleich verteilen, da bei einseitiger Spaltung von 1 Mol Hexobendin jeweils 1 Mol Trimethoxybenzoesäure und 1 Mol Halbester entstehen würde. Dabei wird von der Voraussetzung ausgegangen, daß die an beiden Esterbindungen von Hexobendin gleichzeitig ablaufende Spaltung, die zu 2 Molen Trimethoxybenzoesäure und keinem Halbester führen würde, nur sehr geringe Wahrscheinlichkeit besitzt.

Wie bei der Spaltung von Hexobendin der prozentuell höchste Umsatz bei einer Konzentration von 10 µg/ml Hexobendin erfolgte, so findet man auch bei der Spaltung des Halbesters die günstigsten Bedingungen, wenn man zu Beginn des Experimentes 10 µg/ml Hexobendin eingesetzt hat. Der Unterschied zwischen dem Anteil der Trimethoxybenzoesäure und dem des Halbesters ist nach Angebot von 10 µg/ml Hexobendin am größten (Abb.7).

In Analogie zu den Verhältnissen bei der Spaltung von Hexobendin im Plasma des Meerschweinchen (Abschnitt 3.2.3.1.) läßt sich ein prozentuell höherer Umsatz des Halbesters erklären, wenn man von der Annahme ausgeht, daß der Halbester nicht nur wie Hexobendin im Meerschweinchenplasma gespalten wird, sondern ebenso von enzymatisch inaktiven Plasmaproteinen gebunden wird. Bei höherer Konzentration nimmt dann ebenso die prozentual gebundene Menge ab und die absolute freie Konzentration steigt in höherem Maße an, als bei einfacher Proportionalität mit Erhöhung der Gesamtkonzentration zu erwarten wäre. Dadurch nimmt die Spaltungsgeschwindigkeit in einem Ausmaß zu, daß es noch zu einer Erhöhung des prozentuellen Umsatzes kommen kann.

Diese Spaltung des Halbesters verschwindet unter dem Zusatz von 10^{-4} M/l Reserpin völlig. Auch bei der höchsten Hexobendinkonzentration von 100 µg/ml, die zur höchsten Halbesterakkumulation absolut gesehen führt, kommt es unter Reserpin zu keiner meßbaren Spaltung des Halbesters. Hier wird das Enzymsystem durch die hohen Hexobendin- und Reserpin-

konzentrationen soweit abgesättigt, daß die mit viel geringerer Geschwindigkeit ablaufende Spaltung des Halbesters völlig zurückgedrängt wird.

3.3. BESCHREIBUNG DES UNTERSUCHTEN SYSTEMS

Die Ergebnisse von Abschnitt 3.2. machen nunmehr eine Beantwortung einiger in Abschnitt 3.1.2. gestellter Fragen möglich:

a) Eine Entscheidung über die Einheitlichkeit der Hexobendin spaltenden und bindenen Proteine im Meerschweinchenplasma läßt sich nach den bisher angestellt Überlegungen nicht fällen.
b) Sowohl Reserpin wie auch der Halbester bilden neben Hexobendin Substrate für enzymatisch aktive und inaktive Eiweißkörper.
c) Die Spaltungsgeschwindigkeit bzw. das Bindungsausmaß der drei Substrate verhält sich folgendermaßen: Hexobendin $\sim$ Reserpin $>$ Halbester.
d) Je nach Affinität und vorliegender Konzentration der Substrate kommt es zu Kompetitionseffekten an den Proteinbindungsstellen und damit auch im Fall der enzymatisch aktiven Proteine zu einer Kompetition bei der Spaltung.

Mit Hilfe dieser verschiedenen Wechselwirkungen lassen sich die anfänglich erhobenen Befunde ausreichend erklären. Als Illustration der vorliegenden Verhältnisse mag die schematische Zeichnung der Abb.8 dienen.

Es zeigte sich, daß die Plasmaproteinbindung für das Ausmaß der Spaltung mitverantwortlich sein kann. Bei Erhöhung der Substratkonzentration führt die Erniedrigung der Bindung und damit Erhöhung der freien Konzentration des Substrates zu einem vermehrten Abbau. Ebenso kann der Abbau beschleunigt werden durch gleichzeitige Anwesenheit einer zweiten Substanz, welche die erste Substanz aus ihrer Bindung an enzymatisch inaktive Eiweißkörper verdrängt und damit deren freie Konzentration erhöht, solange nicht der Abbau selbst durch direkte Einflußnahme der zweiten Substanz zu stark gehemmt wird.

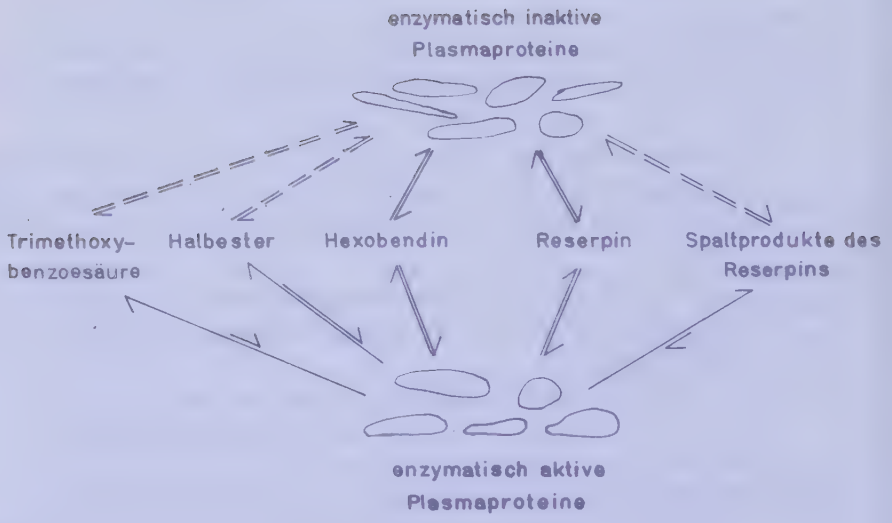


Abb.8: Konkurrenz der enzymatisch aktiven und inaktiven Plasmaproteine bei der Bindung und Spaltung von Hexobendin und Reserpin

4. LITERATURÜBERSICHT, BESPRECHUNG DER BEFUNDE UND AUSWERTUNGSVERFAHREN

Wechselbeziehungen zwischen Arzneimittel und Proteinen sind für die Wirkungen eines Arzneistoffes von großer Bedeutung (16,34,57,119):

a) Die Bindung an Receptoren mit Proteincharakter ist für die pharmakologische Wirkung verantwortlich.
b) Durch die Bindung an Enzymproteine wird der Arzneistoff abgebaut.
c) Durch die Bindung an unspezifische Plasma- und Gewebsproteine wird die freie Konzentration der Substanz, damit die Verteilung und indirekt Wirksamkeit und Inaktivierung beeinflußt.

Diese Konkurrenz zwischen spezifischen Receptor- und Enzymproteinen einerseits und unspezifischen Plasma- und Gewebsproteinen andererseits (19) hat maßgebenden Einfluß auf das pharmakokinetische Verhalten eines Arzneimittels (20,38,42, 92-95,117,118).

Die Beziehung zwischen Plasmaproteinbindung und Wirksamkeit wurde erstmals von DAVIES et al. (32,33) am Beispiel der Sulfonamide untersucht. Seit dieser Zeit wurden viele Experimente durchgeführt, um den Einfluß der Plasmaproteinbindung auf die Wirksamkeit (4,20,31,36,93,101,124,135,137,165,172, 173), Verteilung (17,20,37,38,79,85,91,97,99,102,107,117, 126,136,146,168,170,171,177,178), Ausscheidung(18,20,25,31, 97,118,133,136,142,168) und Metabolisierung (6,18,22,124, 168,176) von Arzneistoffen festzustellen.

KLOTZ et al. (80,81) und KARUSH (76) erkannten die Bedeutung der Phänomene, die auftreten, wenn mehrere Substanzen gleichzeitig vorhanden sind und um die Bindungsplätze an den Proteinen konkurrieren. ODELL (125) zeigte, daß solche Phänomene bei der Entstehung des Kernikterus auch im medizinisch-klinischen Bereich eine Rolle spielen. Der Frage nach der gegenseitigen Verdrängbarkeit verschiedenster Arzneimittel aus ihrer Plasmaeiweißbindung widmete man seitdem größeres Interesse, um die sich daraus ergebenden Folgen

im Hinblick auf die Wirksamkeit, Verteilung, Ausscheidung und Metabolisierung bei gleichzeitigem Vorhandensein von zwei Arzneistoffen kennenzulernen (4,5,19,23,24,27,41,44,54, 74,98,104,168).

Damit stellte sich auch die Frage nach der Natur der Proteinbindung. Während eine Lokalisation der Bindungsstellen erst bei wenigen Substanzen mit einiger Genauigkeit gelungen ist (45,72,72), konnte eine Korrelation zwischen physikochemischen Eigenschaften und Bindungsverhalten gefunden werden (14,43, 51,60,67,79,88,90,110,150,154-156,159).

Die Proteine sind aber nicht als starre Gebilde mit einer bestimmten, unveränderlichen Anzahl von Bindungsplätzen zu verstehen, sondern sie weisen je nach Umgebungsbedingungen und auch Anwesenheit anderer Substanzen eine verschiedene Faltung und sterische Konfiguration auf, wodurch die Bindungsverhältnisse stark beeinflußt werden (26,70,75,82,83,116, 152,166).

4.1. PLASMAPROTEINBINDUNG

4.1.1. Ausmaß der Bindung

Die vorher beschriebene Plasmaproteinbindung von Hexobendin ist im untersuchten Bereich deutlich konzentrationsabhängig (Abb.4). Die Bindung von über 90 % bei einer Gesamtkonzentration von 0,5 ug/ml Hexobendin zeigt einen hohen Prozentsatz von eiweißgebundenen Hexobendin unter therapeutischen Bedingungen an (Abschnitt 3.2.1.1.).

Diese hohe Bindung ist jedoch keine Besonderheit von Hexobendin. Vergleicht man nämlich diese Werte mit der Proteinbindung anderer Pharmaka (57,119) bei therapeutisch verwendeter Konzentration, so findet man auch bei manchen Sulfonamiden (4,124,149,153), Penicillinen (14,137,146,149), Herzglykosiden (109,154), Barbituraten (56), Ataraktika (79), Phenothiazinen (88) und anderen Substanzen proteingebundene Anteile im Plasma von 80 bis 90 %. Doch ist bei dem Versuch einer Einordnung von Hexobendin in Bezug auf das Ausmaß der

Plasmaproteinbindung dieses sicherlich der Gruppe der stark gebundenen Pharmaka zuzuzählen.

Es muß aber auch darauf hingewiesen werden, daß im Ausmaß der Plasmaproteinbindung große Speziesunterschiede beobachtet werden können (4,96,103,128,144).

4.1.2. Art der Bindung

Nachdem eine Bindung der verschiedensten Substanzen durch Eiweißkörper festgestellt worden war, erhob sich die Frage nach der Art der Bindung. Dabei wurde davon ausgegangen, daß eine reversible Bindung eingegangen wird, die dem Massenwirkungsgesetz folgt (Abschnitt 4.1.4.). Um die Art der Bindungskräfte zu charakterisieren, wurden die Eigenschaften der Bindung untersucht.

DOUGLAS et al. (43) fand, daß das Ausmaß der Plasmaproteinbindung von verschiedenen Dicarbamaten mit dem Öl-Wasser-Verteilungsquotienten parallel gehen. Bei ihren Untersuchungen verwendeten die Autoren Baumwollsamenöl als Ölphase.

Diese rein qualitative Beschreibung wurde von HANSCH et al. (59) auch quantitativ erfaßt: Die Bindung von 19 verschiedenen Phenolen an Rinderserumalbumin wurde den jeweiligen Verteilungsquotienten zwischen Octanol und Wasser gegenübergestellt. Es konnte eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Bindungskonstanten und der Verteilungskonstanten π gefunden werden. Als Bindungskonstante wurde die reziproke molare Konzentration genommen, welche für ein 1:1 Bindungsverhältnis zwischen Substanz und Protein notwendig ist. π stellt den Logarithmus des Quotienten dar, der durch Division des Octanol-Wasser-Verteilungsquotienten der jeweiligen Substanz durch den Verteilungsquotienten der Ausgangssubstanz der untersuchten Substanzklasse erhalten wird. Diese Korrelation zwischen einem Bindungsparameter und dem π-Wert wurde von BIRD et al. (14) für die Bindung von 79 Penicillinen an Serumeiweiß bestätigt.

Einen Zusammenhang zwischen Plasmaproteinbindung und Octanol-Wasser-Verteilungsquotienten fand SCHOLTAN et al. (156) auch

für die Bindung von Steroidhormonen und Steroidguanylhydrazonen.

Außerdem konnte SCHOLTAN (155) eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Gesamtbindungskonstante (Summe aller Einzelbindungskonstanten) und dem Logarithmus des Isobutanol-Wasser-Verteilungsquotienten für verschiedene Pharmaka - Sulfonamide, Antibiotica, Cardenolide, Steroidhormone und Steroidguanylhydrazone - aufstellen.

Bei der Untersuchung der Plasmaproteinbindung der Phenothiazinderivate stellte KRIEGLSTEIN et al. (90) fest, daß die Verteilungsquotienten zwischen Heptan und einer Pufferlösung pH 7,4 zum größten Teil mit der Eiweißbindung der untersuchten Verbindungen korreliert ist.

Neben Octanol und Heptan wurde von van der KLEIJN (79) auch Chloroform-Decanol verwendet, um eine Beziehung zwischen dem Verteilungsquotienten und der Plasmaproteinbindung von Ataraktika der Meprobamat- und Diazepin-Gruppe zu finden.

Diese engen Beziehungen, die zwischen lipophilen Eigenschaften der Substanzen und Ausmaß der Eiweißbindung bestehen, werden von den verschiedenen Autoren so interpretiert, daß beim Zustandekommen des Substanz-Protein-Komplexes hydrophobe Bindungskräfte von ausschlaggebender Bedeutung sind.

Auch die Betrachtung thermodynamischer Parameter der Eiweißbindung von Substanzen führte zu dem Ergebnis, daß hydrophobe Bindungskräfte eine wichtige Rolle spielen. Zu diesem Schluß kamen CLAUSEN (28), FRANKE (48) und SCHOLTAN (148,151) nach Berechnung der Reaktionsenergie, Entropie und Enthalpie dieses Bindungsvorgangs.

Aber es fanden sich auch Ergebnisse, daß nicht nur hydrophobe Bindungskräfte am Substrat-Protein-Komplex beteiligt sind, sondern daß auch Ionenbindungen eine gewisse Rolle spielen:

So fand GOLDBAUM et al. (56) bei der Bindung von Barbituraten an Serumalbumin eine deutliche pH-Abhängigkeit, wobei es zu einer Zunahme der Bindung mit steigendem pH der Lösung kam, bis bei Überschreiten von pH 8 ein plötzliches Absinken des Bindungsausmaßes eintrat. Eine ähnliche pH-Abhängigkeit der

Proteinbindung von Phenothiazinen (88,90) und von Sulfonamiden (150) wird als Beweis gewertet, daß bei der Eiweißbindung dieser Substanzen auch Ionenbindungen von Bedeutung sind. Ebenso läßt sich bei Guanylhydrazonen und Steroidhormonen (67,156) und auch Penicillinen (78) eine pH-Abhängigkeit der Bindung nachweisen.

KURZ et al. (105) versuchten den Einfluß von Acidose und Alkalose auf die Bindung von verschiedenen Arzneimitteln an Plasmaproteine zu charakterisieren: eine starke Abhängigkeit des Bindungsausmaßes vom pH des Mediums ist bei Substanzen zu erwarten, die im untersuchten pH-Bereich ihren Dissoziationszustand deutlich ändern.

Wenn man die pH-Abhängigkeit der Bindung diskutiert, muß man sich im gleichen Moment bewußt sein, daß durch pH-Änderungen deutliche Änderungen in der sterischen Konfiguration der Proteine vor sich gehen (82,83,166). So können Hydroxylgruppen in den Aminosäureketten durch Wasserstoffbrückenbindung zu den Aminogruppen die Bindungsmöglichkeiten einschränken (82).

Auch durch die Bindung selbst von Substanzen an Proteine kommt es zu einer strukturellen Änderung der Eiweißkörper (75,82), kenntlich an der Änderung des optischen Drehungsvermögens (26,116,152). Dadurch kann die Konzentrationsabhängigkeit der Bindung deutlich beeinflußt werden (152). Während die Gesamtanzahl der theoretisch vorhandenen Bindungsstellen gleich bleibt, steigt die Zahl der für die Substanz zugänglichen Bindungsplätze mit Erhöhung der Substratkonzentration durch die Entfaltung des Proteinmoleküls an.

Eine umfassende Charakterisierung der Art der Plasmaproteinbindung hat FREDERICQ (49) durchgeführt. Er arbeitete Gesetzmäßigkeiten für den Einfluß der Substituenten heraus, wobei er aromatische und aliphatische Verbindungen mit verschieden substituierten Seitengruppen in ihrem Bindungsverhalten verglich.

Eine genaue Lokalisierung der Bindungsstellen ist bisher noch kaum gelungen. Mithilfe der kernmagnetischen Resonanz

wurde als Bindungsort der Penicilline und Sulfonamide die Phenylgruppe identifiziert (45,72,73). Aus der Beeinflußbarkeit der Bindung verschiedener Phenothiazine an Serumalbumin durch verschiedene aromatische Substanzen, schließt JÄHNCHEN et al. (71) auf Wechselwirkungen zwischen den Benzolringen der Phenothiazinderivate einerseits und dem Albumin andererseits.

Für die Bindung an Proteine sind wahrscheinlich unterschiedliche Molekülgruppen der Eiweißkörper mit verschiedener Affinität verantwortlich. Unterschiede in den Bindungseigenschaften der verschiedenen Plasmaproteine sind seit längerer Zeit bekannt (28,51,57,145,150,154). Auf Grund von chemischen Eingriffen und Veränderungen am Proteinmolekül verlegt DAVISON et al. (34) den Bindungsort für die Salizylsäure und ihre Derivate an die ε-NH_2- und Guanidin-Gruppen der Eiweißkörper. Ebenso werden die α- und ε-Amino- und die Guanidingruppen als Bindungsstellen für Sulfonamide und Tetracycline angenommen (53). Der Bindungsort für Chinidin ist der Imidazolring des Histidins, wie sich nach Beeinflußung der Bindung durch verschiedene Ionen ergeben hat (29).

4.1.3. Kompetitionseffekte bei Vorhandensein mehrerer Substanzen

Die Möglichkeit der Beeinflußung der Eiweißbindung einer Substanz durch eine andere wurde zuerst von KLOTZ et al. (80,81) untersucht. Es zeigte sich, daß verschiedene anorganische Ionen, Puffersubstanzen und auch Chlorid- und Phosphationen, einen kompetitiven Effekt auf die Proteinbindung von organischen Substanzen ausüben (75,78). Von KARUSH (76) wurde der Einfluß einer organischen Substanz auf die Proteinbindung eines Azofarbstoffes chrakterisiert.

Die Bedeutung für die Pharmakotherapie wurde erst 10 Jahre später erkannt, als ODELL (125) über die Verdrängung von Bilirubin aus seiner Plasmaproteinbindung durch Salizylate und Sulfonamide berichtete und darin die Ursache für das gehäufte Auftreten von Kernikterus nach Salizylat- und Sulfonamidtherapie sah.

Die einfache Vorstellung, daß Anionen nur durch Anionen und ebenso Kationen nur durch Kationen verdrängt werden wurde von ANTON (5) widerlegt. Das ist aber auch nach dem Vorhergesagten zu erwarten, da hydrophobe Wechselwirkungen an der Proteinbindung wesentlich beteiligt sind.

Auf die Wichtigkeit der Berücksichtigung der Kompetitionseffekte bei der Plasmaproteinbindung von Pharmaka wurde erneut von CHRISTENSEN et al. (27) verwiesen, der das Auftreten von hypoglykämischen Anfällen im Rahmen einer Antidiabetika-Behandlung darauf zurückführte, daß durch gleichzeitige Einnahme von Sulphaphenazol oder Phenylbutazon die freie Konzentration von Tolbutamid im Serum beträchtlich erhöht ist. Diese erhöhte freie Konzentration, die sich in einer verstärkten Wirkung bemerkbar macht, wird durch eine Verdrängung von Tolbutamid aus seiner Plasmaproteinbindung durch die oben angeführten Pharmaka hervorgerufen.

KUNIN (100) untersuchte die mögliche Verdrängung von Penicillinen aus ihrer Serumeiweißbindung durch verschiedenste Substanzen. Dabei zeigte sich, daß ein Verdrängungseffekt nicht von jeder Substanz ausgeübt werden kann, sondern daß nur ganz bestimmte Stoffe zu einer Kompetition befähigt sind.

Bei der Diskussion der Fehlermöglichkeiten bei der Bestimmung der Plasmaproteinbindung wurde auch auf eine mögliche Kompetition zwischen Penicillinen und Citrat hingewiesen (15). Deshalb wird zur Gerinnungshemmung Heparin empfohlen.

Außerdem wurde nachgewiesen, daß Metaboliten, die durch den Abbau einer Substanz im Organismus entstehen und eine chemische Ähnlichkeit mit der Ausgangssubstanz besitzen, ebenfalls an Plasmaproteine gebunden werden (39) und die Ausgangssubstanz aus ihrer Eiweißbindung verdrängen können (23). Da aber die Metabolisierung im Organismus in die Richtung zielt, eine Substanz polarer und damit ausscheidungsfähiger zu machen, wird dieser Einfluß der Stoffwechselprodukte auf die Bindung der Muttersubstanz selten von großer Bedeutung sein, da ja die Bindungskräfte zwischen

Eiweißmolekülen und Substratmolekülen größtenteils hydrophober Natur sind (Abschnitt 4.1.2.).

Bei der Diskussion unseres Problems haben wir die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß sowohl die enzymatisch aktiven als auch die enzymatisch inaktiven Plasmaproteine mit dem Halbester in Beziehung treten. Denn so läßt sich auch die erhöhte, prozentuelle Spaltung des Halbesters bei höherer Konzentration erklären (Abschnitt 3.2.2.3.)

Aus Gründen der chemischen Verwandtschaft wurde bei den ausgeführten Untersuchungen der Einfluß von Reserpin auf die Plasmaproteinbindung von Hexobendin geprüft. Dabei zeigte sich eine deutliche Kompetition zwischen beiden Substanzen um die Bindungsplätze an den Eiweißkörpern(Abschnitt 3.2.1.2.). Im Gegensatz dazu konnte eine Erhöhung der Bindung von Digitalis-Glykosiden unter Reserpin beobachtet werden (111). Diese scheinbare Diskrepanz läßt sich durch die Annahme einer Verschiedenheit der Bindungsstellen erklären:

Eine Substanz kann eine andere aus ihrer Proteinbindung verdrängen, wenn sie eine Affinität zu den gleichen Bindungsplätzen besitzt (70). Wird sie jedoch an anderen Stellen des Eiweißmoleküls gebunden, kann das durch eine damit hervorgerufene Streckung oder Entfaltung des Proteins entweder zu einer Erhöhung der Bindung der anderen Substanz Anlaß geben (70), keinen Einfluß haben (71) oder aber auch zu einer Abnahme der Bindung führen (77).

Bei den Herzglykosiden scheint nun der Fall vorzuliegen, daß Reserpin verschiedene Bindungsplätze als die Glykoside besetzt und durch seine Bindung an die Plasmaproteine den Zugang für die Glykoside zu deren Bindungsstellen erleichtert (111). Bei der Bindung von Hexobendin jedoch übt Reserpin, auf Grund seiner chemischen Ähnlichkeit wahrscheinlich an gleiche Bindungsstellen gebunden, einen kompetitiven Effekt aus.

4.1.4. Graphische Darstellung und mathematische Formulierung der Plasmaproteinbindung (Auswertungsverfahren)

Auf Grund der bisherigen Untersuchungsergebnisse über das Bindungsverhalten der Plasmaeiweißkörper kann es als sicher gelten, daß die Wechselwirkung zwischen Proteinmolekülen und verschiedenen Substanzen eine Bindungsreaktion ist, die dem Massenwirkungsgesetz gehorcht (51,57,80,90,92,119,140, 145,148,162).

4.1.4.1. Bindungsstellen gleicher Affinität

Nimmt man an, daß sämtliche bindenden Gruppen des Proteins gleiche Affinität besitzen und daß es durch die Bindung zu keiner Beeinflußung der Nachbargruppen kommt, so läßt sich die Reaktion zwischen den Eiweißmolekülen (E) und der zu bindenden Substanz (S) durch die folgende Gleichung beschreiben:

$E + S \rightleftharpoons ES$

E — molare Konzentration der freien Eiweißmoleküle

S — molare Konzentration der freien Substanz

ES — molare Konzentration des Eiweiß-Substanz-Komplexes (der gebundenen Eiweiß- und Substanzmoleküle)

Für die Gleichgewichtskonstante (Dissoziationskonstante) dieser Reaktion gilt:

$$K = \frac{E.S}{ES}$$

K — Dissoziationskonstante

Wenn P die molare Konzentration des gesamten Proteins ist, wobei jedes Proteinmolekül n Bindungsstellen besitzt, ergibt sich als Konzentration aller vorhandenen Bindungsstellen:

$n.P = E + ES$

$E = n.P - ES$

$$K = \frac{(n.P - ES).S}{ES}$$

P — molare Gesamtproteinkonzentration

n — Anzahl der Bindungsstellen pro Proteinmolekül

$$K \cdot ES = n \cdot P \cdot S - ES \cdot S$$

$$K \cdot ES + ES \cdot S = n \cdot P \cdot S$$

$$ES \cdot (K + S) = n \cdot P \cdot S$$

$$\frac{ES}{P} = \frac{n \cdot S}{K + S}$$

Wird die Anzahl der Mole gebundene Substanz pro Mol Gesamtprotein als spezifisches Bindungsvermögen (r) bezeichnet, dann folgt

$$r = \frac{ES}{P}$$

r — molare Konzentration an gebundener Substanz pro Mol Gesamtprotein

$$r = \frac{n \cdot S}{K + S}$$

Damit ist das Massenwirkungsgesetz als Beschreibung der Protein-Substanz-Bindung zur Langmuir'schen Adsorptionsisothermen umgeformt (57,86,123), welche lautet:

$$y = \frac{b \cdot c}{a + c}$$

y — Zahl der gebundenen Moleküle pro Oberflächeneinheit

b — maximale Zahl der Bindungsplätze pro Oberflächeneinheit

a — Gleichgewichtskonstante ($\frac{K_{Desorption}}{K_{Adsorption}}$)

c — freie Konzentration der Moleküle

Beschreibt man das Gleichgewicht zwischen Eiweißmolekülen und Substanzmolekülen durch den reziproken Wert der Dissoziationskonstante, die sogenannte Assoziationskonstante oder Bindungskonstente (k), dann erhält man in ähnlicher Weise eine Umformung, wie sie von manchen Autoren bevorzugt wird (119

$$k = \frac{1}{K}$$

k — Assoziations- oder Bindungskonstante

$$r = \frac{n \cdot S}{\frac{1}{k} + S} = \frac{n \cdot k \cdot S}{1 + k \cdot S}$$

Die typische Adsorptionskurve ergibt sich graphisch bei einer Auftragung der Anzahl der Mole gebundener Substanz pro Mol Protein (r) gegen die freie Konzentration (S).

Um eine lineare Abhängigkeit zu erhalten, welche leichter zu besprechen ist und aus der man die Werte für n und K bzw. k ablesen kann, bietet sich die Möglichkeit, die reziproken Werte von r und S gegeneinander aufzutragen. Diese Art der Darstellung wird in der Enzymologie häufig gebraucht und ist als Lineweaver-Burk-Diagramm bekannt (Abschnitt 4.2.2.).

$$\frac{1}{r} = \frac{K}{n}\cdot\frac{1}{S} + \frac{1}{n}$$

bzw. $$\frac{1}{r} = \frac{1}{k\cdot n}\cdot\frac{1}{S} + \frac{1}{n}$$

Es ist dabei zu beachten, daß bei dieser Darstellung die Punkte niedriger Konzentration weit mehr für die Steigung der Geraden ausschlaggebend sind, als die Punkte höherer Konzentration (57). Da es aber bei höheren Substanzkonzentrationen durch eine Entfaltung des Proteins zu einer Vermehrung der zugänglichen Bindungsplätze kommen kann (Abschnitt 4.1.2.), ist zu erwarten, daß die durch Extrapolation gefundenen Werte für n und K bzw. k von den tatsächlichen abweichen.

Ein besseres Verfahren ist die von SCATCHARD (140) eingeführte Form der Darstellung. Hierbei haben höhere Substratkonzentrationen das gleiche Gewicht. Es wird r/S gegen r aufgetragen:

$$\frac{r}{S} = -\frac{1}{K}\cdot r + \frac{n}{K}$$

bzw. $$\frac{r}{S} = -k\cdot r + k\cdot n$$

Dabei wird oft statt r das Symbol $\bar{\nu}$ verwendet.

SCATCHARD (140) und FREDERIQQ (50) führten auch noch eine Korrektur dieser Gleichung durch unter Berücksichtigung der elektrostatischen Kräfte nach der Debye-Hückel-Theorie und auch der van der Waal'schen Kräfte.

In ähnlicher Art gibt es noch eine weitere Möglichkeit, eine Abbildung mit linearer Abhängigkeit zu erhalten, indem man S/r gegen S aufträgt:

$$\frac{S}{r} = \frac{1}{n} \cdot S + \frac{K}{n}$$

bzw. $$\frac{S}{r} = \frac{1}{n} \cdot S + \frac{1}{k \cdot n}$$

In Form einer Dosis-Wirkungskurve präsentiert sich die Protein-Substret-Bindung bei einer Auftragung 100.r/n gegen log(S). Dabei gibt die Ordinate die Sättigung oder Bindung in Prozenten an, während auf der Abszisse der Logarithmus der Konzentration an freier Substanz zu finden ist. Letztere ist wiederum bei geringer Bindung bzw. hoher Konzentration mit kleinem Fehler dem Logarithmus der Gesamtsubstratkonzentration gleichzusetzen.

Wenn die Natur und die Konzentration des untersuchten Proteins nicht bekannt ist, wird häufig auf diese letzte Darstellungsmöglichkeit zurückgegriffen. Dabei wird als Symbol für Prozent gebundene Substanz β und für die freie Substanz, ebenfalls in Prozent der Gesamtsubstanzkonzentration, α genommen (92) und gegen die Gesamtkonzentration an Substanz aufgetragen (90,146). Dabei bildet β ein Maß für die Bindungsstärke, wenn der Maximalwert fast erreicht wird; das ist der Fall, wenn die Konzentration an Substanz im Vergleich zum bindenen Protein verschwindend gering ist, das heißt S/n.P gegen Null geht (119). α und β hängen folgendermaßen mit den vorhergenannten Bindungsparametern zusammen:

$$\alpha = \frac{K + S}{n \cdot P + K + S} \quad (117)$$

bzw. $$\alpha = \frac{1 + k \cdot S}{n \cdot k \cdot P + 1 + k \cdot S}$$

α — Konzentration an freier Substanz in Prozent der Gesamtsubstanzkonzentration

$$\beta = \frac{1}{1 + \frac{S}{n \cdot P} + \frac{K}{n \cdot P}} \quad (57)$$

bzw.

$$\beta = \frac{1}{1 + \frac{S}{n \cdot P} + \frac{1}{n \cdot k \cdot P}} \quad (119)$$

β — Konzentration an gebundener Substanz in Prozent der Gesamtsubstanzkonzentration

In unserem Fall wurde als Darstellung der Plasmaproteinbindung von Hexobendin auch die Auftragung von α und β gegen den Logarithmus der Gesamtkonzentration gewählt, da im Plasma ja verschiedene Eiweißkörper vorliegen (Abb.4 und 5).

KRÜGER-THIEMER (92) beschreibt die Plasmaproteinbindung auch mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes, von welchem er die Langmuir'sche Adsorptionsisotherme in folgender Form ableitet (die Konstanten a und b der Langmuir'schen Beziehung ersetzt KRÜGER-THIEMER durch α und β, die aber um Verwechslungen zu vermeiden in folgenden Text mit α' und β' bezeichnet werden):

$$C_{ges} = C_{frei} \cdot (w + \frac{\beta' \cdot p}{\alpha' + C_{frei}}) \quad (92)$$

Auch hier wurden Möglichkeiten zur Linearisierung der Darstellung angegeben:

$$\frac{\beta' \cdot p}{C_{geb}} - \frac{K_{dp}}{C_{frei}} = 1 \quad (119)$$

$$C_{frei} = \beta' \cdot \frac{p \cdot C_{frei}}{C_{ges} - C_{frei} \cdot w} - K_\beta \quad (162)$$

C_{ges} — Gesamtkonzentration der zu bindenden Substanz (µMol/l)

C_{frei} — Konzentration der freien Substanz (µMol/l)

C_{geb} — Konzentration der gebundenen Substanz (µMol/g)

w — Wassergehalt des Blutplasmas (ml/ml) ca. 0,95 (20)

p — Gesamtproteinkonzentration des Plasmas (g/l)

β' — spezifische Maximaladsorption (µMol/g)

α' — C_{frei} bei Adsorptionshalbsättigung (µMol/l) auch als "intrinsic Dissoziationskonstante" bezeichnet (K_{dp}, K_β)

Damit läßt sich also auch die Bindung einer Substanz im Plasma beschreiben, wenn die Art und Menge des bindenden Eiweißkörpers nicht bekannt ist, vorausgesetzt werden jedoch Bindungsstellen einheitlicher Affinität.

4.1.4.2. Bindungsstellen verschiedener Affinität

Diese idealisierte Behandlung des Problems der Proteinbindung, bei der nur eine Art von Bindungsstellen gleicher Affinität angenommen wird, genügt jedoch nur in seltenen Fällen. So findet man häufig bei einem Vorgehen nach den vorher aufgezeigten Richtlinien, daß die gefundenen Ergebnisse sich nicht in eine lineare Beziehung zueinander bringen lassen. In diesem Fall kann die Möglichkeit erwogen werden, daß es sich um verschiedenartige Bindungsstellen handelt (56,75). Die Erweiterung der Langmuir'schen Adsorptionsisothermen auf Grund des Massenwirkungsgesetzes lautet dann (75,145):

$$r = \sum_i \frac{n_i \cdot k_i \cdot S}{1 + k_i \cdot S}$$

n_i, k_i — Anzahl und Assoziationskonstanten der Bindungsstellen der i-ten Klasse

Bei dieser Betrachtung wird das bindende Protein zwar mit verschiedenen Bindungsstellen angenommen, doch unter der Voraussetzung, daß nur eine Proteinart im untersuchten System vorliegt.

ROSENTHAL (138) gibt eine graphische Methode an, die Bindungsparameter in einem komplexen System darzustellen, in welchem nicht nur verschiedene Bindungsstellen an einer Proteinart in Rechnung gestellt werden, sondern auch Proteine unterschiedlicher Beschaffenheit möglich sind. Ähnlich der Darstellung von SCATCHARD (140) wird C_{geb}/C_{frei} gegen C_{geb} aufgetragen:

$$\frac{C_{geb}}{C_{frei}} = \sum_{ij} k_i \cdot (n_i \cdot P_j - C_{geb})$$

P_j — Proteinkonzentration der Proteine j-ter Art

Bei Bindungsstellen verschiedener Affinität erhält man eine gekrümmte Gesamtbindungslinie. Die Bindungslinien für die einzelnen Bindungsstellen gleicher Affinität erhält man, indem man den Abstand vom Ursprung (O) des Koordinatensystems zu einem Punkt der Gesamtbindungskurve (P_3) in Abschnitte unterteilt und diese in derselben Richtung von Ursprung

aus aufträgt. Dadurch werden die Koordinaten eines Punktes der Gesamtbindungskurve (P_3) in die Koordinaten der Punkte (P_1,P_2) der einzelnen Bindungsgeraden eines jeden einheitlichen Systems bei einer bestimmten freien Konzentration unterteilt. Die mathematische Formulierung, um die jeweiligen Assoziationskonstanten und Bindungskapazitäten der Bindungsklassen zu errechnen, wurde von HART (62) angegeben. Es muß jedoch zu dieser Art der Darstellung und Aufschlüsselung der einzelnen Bindungsklassen bemerkt werden, daß die Genauigkeit der experimentellen Ergebnisse selten eine Annahme von mehr als drei Bindungsklassen rechtfertigen werden (138).

Die Abb.9 zeigt die vorgestellten Resultate nach dem Verfahren von ROSENTHAL (138) behandelt. Es wurde eine gekrümmte Gesamtbindungslinie erhalten, die die Annahme zuläßt, daß für Hexobendin im Meerschweinchenplasma mehr als eine Art von Bindungsstellen zur Verfügung steht. Auch alle vorher angeführten Darstellungsarten der Plasmaproteinbindung, welche für die vereinfachende Annahme von Bindungsstellen einheitlicher Affinität lineare Beziehungen ergeben, führen auf die vorliegenden Ergebnisse angewendet zu gekrümmten Linien. Es kann also angenommen werden, daß Hexobendin an mindestens zwei Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität gebunden wird, wobei die Möglichkeit offen bleibt, ob diese Bindungsstellen nur am Albumin oder auch an anderen Plasmaproteinen, z.B. Globulinen, zu suchen sind.

4.1.4.3. Freundlich'sche Adsorptionsisotherme

Die von Freundlich empirisch gefundene Beschreibung der Adsorptionsphänomene (86,123) stimmt in niedrigen Konzentrationsbereichen annähernd mit dem Massenwirkungsgesetz und damit mit der Langmuir'schen Beziehung überein (37):

$y = k^{\equiv} \cdot s^{1/n}$ $\quad k^{\equiv}$ — Adsorptionskonstante

$1/n$ — Adsorptionsexponent

Dieser Zusammenhang zwischen freier und gebundener Substanz läßt sich mit gutem Erfolg zur Beschreibung der Plasmaproteinbindung von Pharmaka heranziehen. Man erhält über einen relativ weiten Konzentrationsbereich eine lineare Beziehung

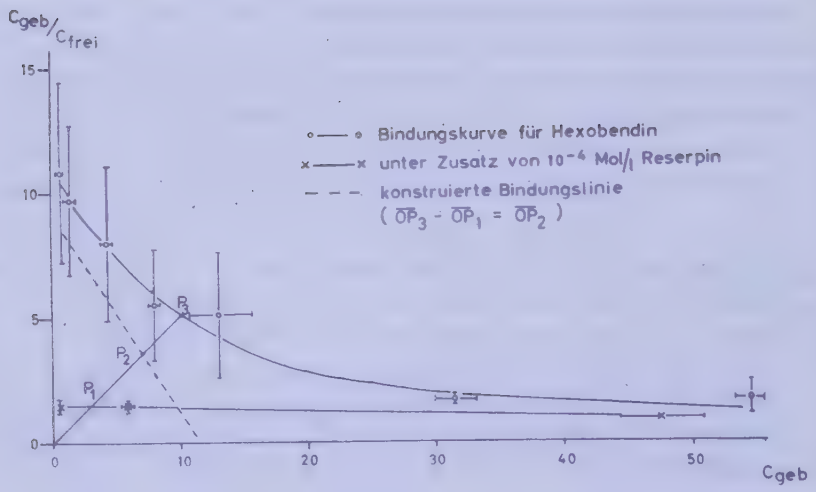


Abb.9: Proteinbindung von Hexobendin im Meerschweinchenplasma in Anwesenheit von 10^{-4} M/l Reserpin

Der Quotient aus gebundener Konzentration durch freie Konzentration wurde gegen die gebundene Konzentration aufgetragen (ROSENTHAL (138)).

Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 4 bis 7).

zwischen dem Logarithmus der gebundenen Konzentration (C_{geb}) und dem Logarithmus der freien Konzentration (C_{frei}) der zu bindenden Substanz, auch dann, wenn verschiedene Bindungsstellen beteiligt sind. Die daran vielfach geübte Kritik ist die Tatsache, daß die konstanten Glieder der so gefundenen Adsorptionsgeraden keine chemisch-physikalische oder thermodynamische Bedeutung besitzen (57).

SCHOLTAN et al. (145-148,151) verwendet diese Form der Darstellung seiner Bindungsergebnisse und diskutiert die gefundene Gerade (148):

$$C_{geb} = k^m . C_{frei}^{\ m}$$

$$\log(C_{geb}) = \log(k^m) + m . \log(C_{frei})$$

Die Bindungskonstante k^m gibt an, wievielmal größer C_{geb} bei der gewählten Einheit der Konzentration (z.B. 1 µMol/l) als C_{frei} ist.

Bei dieser doppeltlogarithmischen Darstellung der Versuchsergebnisse erhält man in vielen Fällen Bindungsgeraden mit einer Steigungskonstante m, die kleiner als 1 ist. Entsprechend ergeben sich bei der graphischen Darstellung nach Langmuir gekrümmte Bindungslinien. Dafür werden zwei Möglichkeiten der Erklärung angeboten: verschiedene Affinität der vorhandenen Bindungsstellen oder Wechselbeziehungen zwischen Substanzmolekülen und Proteinmolekülen, die zu einer Konfigurationsänderung des Proteinmoleküls führen (148).

Die Freundlich'sche Adsorptionsisotherme kann die Verhältnisse der Adsorption nur in einem unteren Konzentrationsbereich beschreiben. Denn es ist unmöglich, daß bei gleichem Proteingehalt die gebundene Konzentration bis ins Unendliche zunehmen kann, wenn die freie Konzentration theoretisch unendlich erhöht wird. Das heißt, daß nur in einem gewissen Konzentrationsbereich bei doppelt logarithmischer Darstellung eine Gerade, in höheren Konzentrationen aber ein Abweichen von der Geraden zu erwarten ist (145).

Wenn man die vorliegenden Bindungsergebnisse von Hexobendin in doppelt logarithmischer Weise aufträgt (Abb.10), findet man erwartungsgemäß in einem unteren Konzentrationsbereich (bis C_{frei} = 5 µg/ml) eine lineare Abhängigkeit zwischen

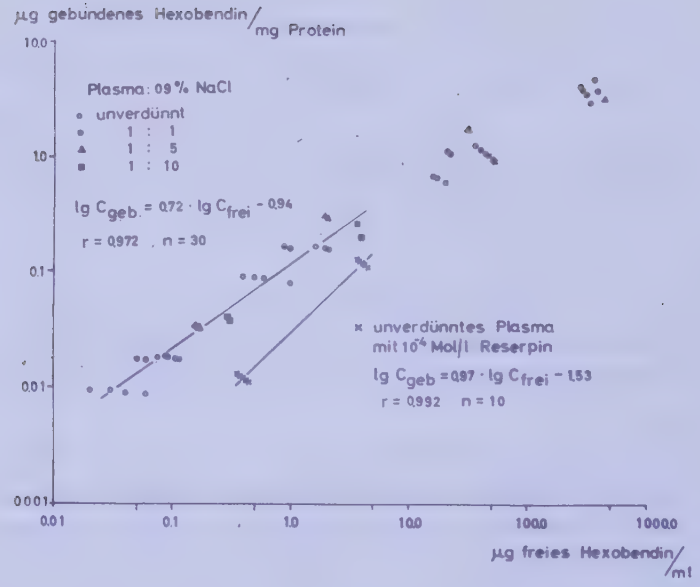


Abb.10: Proteinbindung von Hexobendin im Meerschweinchenplasma in Anwesenheit von 10^{-4} M/l Reserpin

Die pro mg Plasmaprotein gebundene Hexobendinmenge wurde gegen die freie Konzentration als Freundlich'sche Adsorptionsisotherme doppeltlogarithmisch aufgetragen und die Regressionsgeraden berechnet (57,86,123,148).

den Logarithmen der Konzentrationen an freiem und gebundenem Hexobendin, in höheren Konzentrationen eine Abweichung von der Geraden. Ebenso erfüllt sich die Voraussage, daß bei gekrümmter Bindungslinie in der Scatchard-Auftragung hier nun eine Steigung unter 1 gefunden wird, ein Hinweis auf die Beteiligung unterschiedlicher Bindungsstellen.

4.1.4.4. Kompetition mehrerer Substanzen um gleiche Bindungsstellen

Bei gleichzeitigem Vorhandensein mehrerer Substanzen ist die Möglichkeit gegeben, daß Bindungsstellen eine Affinität zu jeder dieser Substanzen besitzen. Dadurch kommt es zu den schon vorher beschriebenen Kompetitionseffekten (Abschnitt 4.1.3.).

Die theoretische Behandlung dieses Problems wurde von KLOTZ et al. (80,81) begonnen. Die Erweiterung der Langmuir'schen Adsorptionsgleichung, die aus dem Massenwirkungsgesetz abgeleitet worden war, lautet:

$$r_a = \frac{n.k_a.A}{1 + k_a.A + k_b.B}$$

$$r_b = \frac{n.k_b.B}{1 + k_b.B + k_a.A}$$

a, b — Indices der Substanzen

A, B — freie Konzentration

bei Vorhandensein der Substanzen A und B, die durch gleiche Bindungsstellen gebunden werden.

KARUSH (76) weitete dann das System auf Bindungsstellen mit verschiedener Affinität aus. Dabei wurde die Eigenkompetition mit der Fremdkompetition verglichen. Für diesen Zweck wurden "competition differentials" $\Delta(A)$ und $\Delta(B)$ eingeführt. Der Einfluß von Na-Dodecyl-Sulfat auf die Eiweißbindung (Rinderserumalbumin) eines Azofarbstoffes wurde als Beispiel untersucht.

Liegt eine Bindung nur an Bindungsstellen einheitlicher Affinität vor, so kann man den kompetitiven Einfluß einer zweiten Substanz ähnlich wie in der Enzymchemie darstellen (161). Bei einer reziproken Auftragung ($1/r_a$ gegen $1/A$ bzw. $1/r_b$ gegen $1/B$)

erhält man in diesem Fall zwei Bindungslienien, die einen gleichen Schnittpunkt mit der Ordinate aber unterschiedliche Steigung besitzen.

Da die Bindung von Hexobendin an die Proteine des Meerschweinchenplasmas durch Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität erfolgt, treten keine Graden sondern Kurven auf. Es wurde auf eine graphische Darstellung in der eben beschriebenen Art verzichtet. Doch wurde die Bindung von Hexobendin auch unter dem Einfluß von Reserpin in Abb.9 und 10 eingezeichnet.

In der Abb. 10 ist zu sehen, daß die Bindungslinie unter Reserpin eine veränderte Steigung aufweist: Handelt es sich bei Reserpin um einen kompetitiven Inhibitor der Plasmaproteinbindung von Hexobendin, dann ist ein Konvergieren der beiden Bindungslinien bei höheren Hexobendinkonzentrationen zu erwarten, da der Einfluß einer gleichbleibenden Reserpinkonzentration durch Überhöhung des Hexobendinangebotes immer mehr zurückgedrängt werden muß. Interessant ist aber, daß nun eine Steigung von ungefähr 1 erreicht wird, welche so gedeutet werden kann (Abschnitt 4.1.4.3.), daß die Bindung von Hexobendin bei gleichzeitiger Anwesenheit von 10^{-4} M/l Reserpin nur noch an einer Art von Bindungsstellen einheitlicher Affinität erfolgt, weil die anderen möglichen Bindungsstellen von Reserpin besetzt sind.

In Abb.9 läßt sich nach dem Verfahren von ROSENTHAL (138) diese Annahme weiter stützen. Zeichnet man die Bindung von Hexobendin unter Anwesenheit von Reserpin in das Diagramm ein, so erhält man eine Gerade, die hier ein Zeichen für einheitliche Bindungsstellen ist, von welchen nur Hexobendin gebunden werden kann. Konstruiert man eine zweite Bindungslinie in der Art, daß man sich die Bindungskurve für Hexobendin allein als Summe der beiden Bindungsgeraden (bezogen auf den Ursprung)denkt, so erhält man in guter Annäherung eine zweite Gerade, die nun die Bindungslinie derjenigen Bindungsplätze darstellt, welche sowohl von Hexobendin wie auch von Reserpin besetzt werden können (Abschnitt 4.1.4.2.).

Damit läßt sich die Hypothese aufstellen, daß Hexobendin im Meerschweinchenplasma an zwei verschiedene Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität gebunden wird, wobei für eine

Art dieser Bindungsstörung Reserpin als kompetitiver Inhibitor der Bindung von Hexobendin auftritt.

4.1.4.5. Einfluß einer Plasmaverdünnung auf die Bindung einer Substanz

Eine Verdünnung des Plasmas verschiebt das Gleichgewicht zwischen gebundener und freier Substanz. Während kein direkter Einfluß auf das Verhältnis gebundene Substanz pro Mol Protein ausgeübt wird, wird sehr wohl die freie Konzentration erniedrigt. Dadurch kommt es zu einer Dissoziation des Protein-Substrat-Komplexes bis ein neues Gleichgewicht wiedererreicht ist (139). Berücksichtigt man bei der Bindung nicht die verminderte Proteinkonzentration, so sinkt die Konzentration an gebundener Substanz pro ml ab und die Bindungslinien werden parallel verschoben (Abb.4, 145).

Anders ist es, wenn das spezifische Bindungsvermögen r oder die pro mg Protein gebundene Substanzmenge betrachtet werden. SCHOLTAN (145) beschreibt bei Untersuchungen der Bindung von Sulfonamiden an Albumin, daß die Bindungsfähigkeit doch nicht einfach proportional der Albuminkonzentration ist. Dabei zeigt sich, daß das spezifische Bindungsvermögen mit steigender Proteinkonzentration nicht erwartungsgemäß konstant bleibt, sondern durch Abnahme der bindenden Stellen verringert wird. Diese Tatsache wird erklärt, daß in konzentrierten Eiweißlösungen keine von Lösungsmittelmolekülen völlig umgebene Einzelmoleküle des Albumins vorliegen. Infolge der relativ dichten Packung der Albuminmoleküle und infolge einer eventuell zwischen ihnen bestehenden Wechselwirkung bilden sich in der Lösung lockere Assoziate von Albuminmolekülen. Die Zahl der bindenden Gruppen wird daher in konzentrierter Lösung nicht der maximal vorhandenen Anzahl am Molekül entsprechen, sondern kleiner sein. Eine Verdünnung der Lösung führt jedoch dazu, daß die in konzentrierten Lösungen vorhandenen Proteinassoziate dissoziieren und vorher unzugängliche Haftstellen am Albuminmolekül frei werden.

Werden die Bindungswerte für Hexobendin im Meerschweinchenplasma bei verschiedener Verdünnung (Abb.4) auf eine Protein-

menge von 1 mg bezogen, so zeigt sich in diesem Fall keine Abhängigkeit der Bindungswerte vom Grad der Verdünnung (Abb.10). Als Proteinkonzentration des Meerschweinchenplasmas wurden 5 g% angenommen (143). Die erhaltenen Werte liegen im Bereich der Ergebnisse der Hexobendinbindung in unverdünnten Plasma. Der von SCHOLTAN (145) für verschieden konzentrierte Albuminlösungen beschrieben Effekt läßt sich somit durch unsere Resultate nicht bestätigen, wobei es sich aber in unserem Fall um andere experimentelle Verhältnisse handelt, Plasma statt Albuminlösung und Hexobendin statt Sulfonamiden.

In der Literatur finden sich verschiedene empirische Methoden, den Einfluß einer Verdünnung der bindenden Proteine graphisch darzustellen:

KLINOFF et al.(13) findet bei Bindungsexperimenten mit Penicillinen im Serum eine lineare Abhängigkeit zwischen dem Logarithmus der freien Substanzkonzentration in Prozenten der Gesamtkonzentration und dem Logarithmus der Serumkonzentration in Prozenten des unverdünnten Serums. Diese Möglichkeit der Darstellung der Ergebnisse, die mit verdünntem Plasma erhalten wurden waren, wurde für die Bindung von Hexobendin in Betracht gezogen. Dabei lassen sich für jede Hexobendinsubstratkonzentration Gerade zeichnen, welche einen konvergierenden Verlauf zeigen. Mit zunehmender Plasmaverdünnung konvergieren die drei gezeichneten Geraden gegen den Wert 100 % freies Hexobendin, wie es zu erwarten ist, wenn durch die Proteinverdünnung ein Partner des Bindungsgleichgewichtes zunehmend entfernt wird.

Ein anderes graphisches Verfahren, die Plasmaverdünnung zu berücksichtigen, wird von VERWEY et al. (170,171) beschrieben. Bei der Untersuchung der Bindung von Penicillinen in Humanplasma erhält er eine lineare Beziehung zwischen dem prozentuell gebundenen Anteil an der Substratgesamtkonzentration und dem Logarithmus der Plasmaproteinkonzentration (g%). Diese Möglichkeit der Darstellung ergab für die hier mitgeteilten Resultate keine lineare Abhängigkeit, sondern gekrümmte Linien dieser Art, daß bei Erhöhung der Proteinkonzentration ein geringeres Ansteigen der gebundenen Menge zu verzeichnen war, als nach VERWEY et al. (170,171) zu

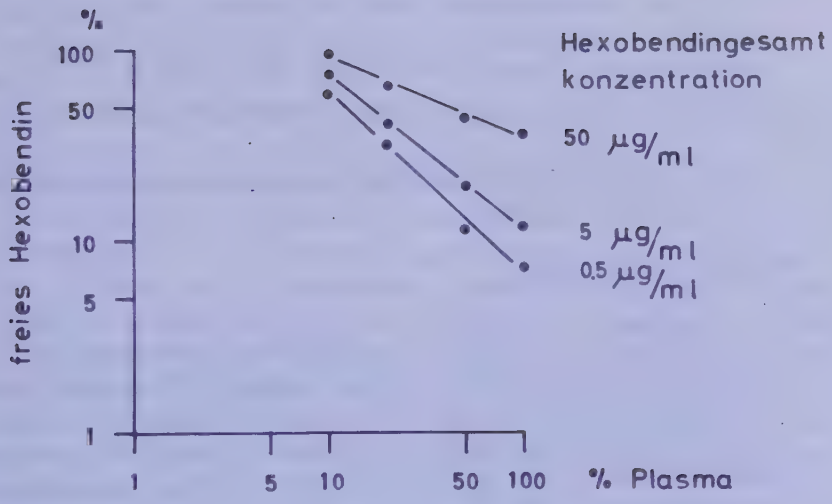


Abb.11: Einfluß der Plasmaverdünnung auf die Bindung von Hexobendin

Die freie Hexobendinkonzentration in Prozent der Gesamtkonzentration wurde gegen die Plasmakonzentration in Prozent des unverdünnten Plasmas in ein doppeltlogarithmisches Diagramm eingezeichnet (BENNETT et al. (13)).

Mittelwerte von jeweils 4 Einzelbestimmungen.

erwarten war.

Damit weichen unsere Ergebnisse in diesem Fall in der entgegengesetzten Richtung als von den Befunden von SCHOLTAN (145) ab. Gegenüber VERWEY et al. (170,171) wurde eine zu geringe Zunahme der Proteinbindung von Hexobendin bei Erhöhung der Proteinkonzentration beobachtet, während diese Zunahme nach den Beobachtungen von SCHOLTAN (145) als zu hoch erscheint. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich auf die Verschiedenheit der Versuchsbedingungen zurückzuführen.

4.1.5. Pharmakologische Bedeutung der Plasmaproteinbindung von Pharmaka

4.1.5.1. Wirksamkeit

Die Bindung von Arzneimitteln an Plasmaproteine und die Möglichkeit sich gegenseitig dabei zu beeinflußen bringt mehrere Konsequenzen mit sich. Seit den Befunden von DAVIES et al. (32,33) konnte immer wieder bei verschiedenen Substanzen nachgewiesen werden, daß ein Zusammenhang zwischen Eiweißbindung und biologischer Wirksamkeit besteht. Nur die freie, nicht gebundene Substanz tritt mit den für die Wirkung verantwortlichen Strukturen, z.B. Bakterien, Rezeptoren, in Beziehung. Der dissoziable Substrat-Plasmaprotein-Komplex bildet aber ein Depot für eine Nachlieferung freier und damit wirksamer Substanz, wenn die freie Konzentration durch Eliminationsprozesse erniedrigt wird (16,18,91). Durch Verdrängung von Arzneimitteln aus ihrer Eiweißbindung kommt es über eine Erhöhung der Konzentration an freier Substanz zur Wirkungsverstärkung (4,24,27,98,104).

Nicht nur Arzneistoffe zeigen die Eigenschaft, mit Proteinen Komplexe zu bilden, sondern auch viele physiologisch im Körper vorkommende Ionen (63,141) und Hormone (31,120,134, 157,163,165,173). Auch auf deren Eiweißbindung kann durch Pharmaka Einfluß genommen werden, wodurch der Wirkungsmechanismus mancher Arzneimittel erklärt wird (168). So wird zum Beispiel die Blutzucker senkende Wirkung der Sulfonylharnstoffderivate auf eine Verdrängung von Insulin aus seiner Proteinbindung zurückgeführt (44).

Aus Grund der indirekten Proportionalität zwischen Plasmaproteinbindung und Wirksamkeit (4,36,83,101,124,135,137,178) gibt es auch Versuche, aus physikochemischen Daten, die für die Eiweißbindung bestimmend sind, direkt die biologische Wirksamkeit vorauszusagen (153).

4.1.5.2. Verteilung, Penetration

Für die Konzentration im Gewebe ist ebenso die freie Plasmakonzentration von ausschlaggebender Bedeutung. Denn nur den nicht an Plasmaproteine gebundenen Arzneimittelmolekülen ist es möglich durch Membranen zu penetrieren. Damit erhält die Plasmaeiweißbindung bestimmenden Einfluß auf die Verteilung von Arzneimitteln im Organismus (42,99,117,136). Als Zeichen dafür entspricht die Konzentration eines Pharmakons in Extracellularflüssigkeit (146,170,171), Liquor cerebrospinalis (37, 144,178) oder Augenkammerwasser (54) der Konzentration an freier Substanz im Plasma. Die freie Konzentration im Plasma steht im Ausgleich mit allen Wasser-Kompartments des Körpers, in die die Substanz penetrieren kann (38).

Der Einfluß der Plasmaeiweißbindung auf die Aufnahme von Pharmaka ins Gewebe wurde auch an isolierten Organen nachgewiesen (85,91,126).

Es muß aber auch der Einfluß der Plasmaproteinbindung auf die Penentrationsfähigkeit von Pharmaka bei verschiedener Injektionsgeschwindigkeit beachtet werden. Bei langsamer Injektion kommt es zu einer flachen Konzentrationswelle. Bei schneller Injektion ist die Konzentrationswelle höher, damit ist auch der freie, nicht proteingebundene Anteil an der Gesamtkonzentration und dadurch der für die Diffusion ins Gewebe maßgebliche Konzentrationsgradient größer (107).

Die einmal geäußerte Ansicht (177), daß die Albuminbindung den Durchtritt von Pharmaka durch Membranen beschleunigt, weil albumingebundene Stoffe grenzflächenaktiver sind, ist in dieser Form wohl nicht haltbar. Vielmehr ist sowohl für die Plasmaproteinbindung wie auch für die Membranpermeation die lipophilen Eigenschaften von großer Bedeutung, und es kann außerdem angenommen werden, daß auch das Ausmaß einer

intrazellulären Bindung an Protein dadurch bestimmt wird. So ist es verständlich, daß bei stärker gebundenen Stoffen das Permeationsgleichgewicht rascher erreicht werden kann, und es intrazellulär gegenüber der freien Konzentration im Plasma zu einer höheren Anreicherung der Substanz kommen kann.

4.1.5.3. Elimination, Filtration und Metabolisierung

Die Eiweißbindung im Plasma ist jedoch nicht nur für die Permeation sondern auch für die Filtration von großer Wichtigkeit. Bei der Ausscheidung durch die Niere muß die glomeruläre Filtration von der tubulären Rückresorption in der Betrachtung geschieden werden: Es können nur freie, nicht proteingebundene Moleküle filtriert werden, und dadurch findet sich im Ultrafiltrat eine Konzentration, die mit der freien Konzentration im Plasma übereinstimmt. Hingegen beeinflußt die Plasmaproteinbindung die tubuläre Rückresorption in praktisch nicht meßbarem Ausmaß (133). Dadurch hat die Plasmaeiweißbindung je nach Eliminationsmodus in der Niere einen unterschiedlichen Einfluß auf die renale Clearence der verschiedenen Substanzen (23,136,142,144,172).

Eine Verzögerung der Elimination wird bei Absinken des Pharmakon-Blutspiegels noch deutlicher, da die Plasmaproteinbindung bei Erniedrigung der Konzentration zunimmt und damit die freie Konzentration stärker verringert, als der ausgeschiedenen Menge entsprechen würde (118).

Bei peritonealer Dialyse zur Beschleunigung der Elimination von Substanzen kann die Effektivität gesteigert werden, wenn Albumin der Dialysierflüssigkeit zugesetzt wird. Durch die Bindung der Substanz an Albumin im Dialysat wird die freie Konzentration erniedrigt und der Konzentrationsgradient zwischen Plasma und Dialysat erhöht (25).

Zuletzt muß auf den Einfluß der Plasmaproteinbindung auf die Metabolisierung von Arzneimitteln eingegangen werden. Damit ein Stoff enzymatisch angegriffen werden kann, muß er eine Zwischenverbindung mit dem Enzymprotein eingehen (Abschnitt 4.2.2.). Damit kommt es zu einer Konkurrenz zwischen enzymatisch aktiven und inaktiven Bindungsstellen, wobei das

Gleichgewicht von der Affinität und der Konzentration der Reaktionspartner bestimmt wird.

So konnte bei der Untersuchung der Sulfonamide eine indirekte Proportionalität zwischen Ausmaß der Metabolisierung und Plasmaproteinbindung gefunden werden (6,124,176).

In ähnlicher Weise üben die Plasmaeiweißkörper durch ihre Bindungsfähigkeit einen stabilisierenden Effekt auch bei einem nicht enzymatischen Zerfall aus: Durch die Bindung von Thyroxin und Jodophenol an Plasmaproteine wird der Zerfall dieser Substanzen verlangsamt (167).

Die Verzögerung der metabolischen Elimination zusammen mit der der renalen Filtration durch Bindung von Substanzen an Plasmaproteine führt zu einer erhöhten Verweildauer im Organismus. Diese Tatsache konnte mehrmals experimentell nachgewiesen werden (20,97,154).

Auch eine mathematische Formulierung der Beeinflußung des pharmakokinetischen Verhaltens einer Substanz durch Plasmaeiweißbindung wurde von mehreren Autoren angeboten (92,94, 95,117,118). Dadurch sind auch Voraussagen über das Verhalten des Stoffes im Organismus möglich, wenn man verschiedene Kenngrößen ermittelt hat.

Plasmaproteine haben aber nicht immer einen hemmenden Einfluß auf die Metabolisierung, sie können auch zu einer Enzymaktivierung, besser Enzymreaktivierung führen: Am Beispiel des Suramins als Inhibitor verschiedener Enzyme wurde gezeigt, daß die Plasmaproteine durch Bindung einer hemmenden Substanz die verminderte Aktivität des Enzyms zu erhöhen imstande sind (6,169).

Die Entstehung von Metaboliten, welche die Ausgangssubstanz aus ihrer Plasmaproteinbindung verdrängen (Abschnitt 4.1.3.), führt durch Erhöhung der freien Konzentration zu einer beschleunigten Elimination. Dabei nimmt die glomeruläre Filtration (23) wie auch die Metabolisierung (18,22) zu.

4.2. ENZYMATISCHE ESTERSPALTUNG

4.2.1. Art des Enzyms

Unter den verschiedenen Esterasen des menschlichen und tierischen Organismus haben die Cholinesterasen schon in früher Zeit große Beachtung erhalten (7). Dabei konnte mit Hilfe der Substratspezifität die Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) von den übrigen Esterasen abgetrennt werden (7,12,175). Allerdings ist auch diese nicht ganz einheitlich in ihrer Spezifität (12,112,129). Unspezifischer sind die Cholinesterasen (EC 3.1.1.8), welche verschiedene Cholinester spalten und durch Physostigmin hemmbar sind (1,7,8,9,12,112,121,129).

Sehr verwandt sind schließlich auch die Carboxylesterasen (EC 3.1.1.1), auch Aliesterasen oder B-Esterasen genannt (3), die starke verschiedenste Substrat- und Speziesunterschiede aufweisen ([illegible],[illegible],12,21,[illegible],55,64,68,112,115,122,129,158).

Da es nicht möglich und für die aufgeworfene Fragestellung nicht interessant war, die untersuchte Esterase genau zu klassifizieren, soll nur festgestellt werden, daß es sich bei dem hexobendinspaltenden Enzym um eine oder mehrere Carboxylesterasen handelt, die auch für die Spaltung anderer Arzneimittel, z.B. der Tropaalkaloide (55,115,158) verantwortlich sind.

Parallel zu dem Befund, daß die Hydrolysegeschwindigkeit für Hexobendin im Meerschweinchenplasma im Vergleich zum Plasma anderer Arten am größten ist (128), wird Reserpin im Organismus des Meerschweinchens am schnellsten gespalten (160). Außerdem besitzt das Meerschweinchen die höchste Carboxylesteraseaktivität innerhalb der untersuchten Spezies (3,9,112).

4.2.2. Enzymkinetik

4.2.2.1. Michaelis-Menten-Theorie

Auf Grund von Versuchen über die enzymatisch katalysierte Rohrzuckerinversion stellten MICHAELIS und MENTEN 1913 ein Reaktionsschema auf, das ihre Ergebnisse erklären sollte

(66): Es wird angenommen, daß zwischen Enzym (E) und Substrat (S) eine Zwischenverbindung (ES) eingegangen wird, welche dann wieder in das freie unveränderte Enzym und die verschiedenen Substratumbauprodukte (Pr) zerfällt (11,40,84,123).

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} E + Pr$$

Trägt man die Anfangsgeschwindigkeit (v) einer Enzymreaktion gegen steigende Substratkonzentrationen auf, erhält man eine rechtwinkelige Hyperbel. Bei hoher Substratkonzentration wird schließlich die maximale Geschwindigkeit der Reaktion erreicht (Vmax). Wenn man die Substratkonzentration, bei welcher Vmax/2 erreicht wird, mit Km bezeichnet, so erhält man folgende mathematische Beziehung:

$$v = \frac{Vmax \cdot S}{Km + S}$$

v — Anfangsgeschwindigkeit der enzymatisch katalysierten Reaktion

Vmax — maximale Anfangsgeschwindigkeit

S — molare Substratkonzentration

Km — Michaelis-Konstante

Die Michaelis-Konstante wird in Einheiten der Konzentration angegeben und stellt die Substratkonzentration dar, bei welcher die halbmaximale Anfangsgeschwindigkeit (Vmax/2) erreicht wird.

$$Km = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

gibt den Zusammenhang zwischen der Michaelis-Konstanten und den anfangs eingeführten Dissoziationskonstanten im Gleichgewicht an. Je nachdem, welche Werte diese annehmen, wird Km von ihnen bestimmt, d.h. je nachdem, welche Reaktion geschwindigkeitslimitierend ist, die Bildung oder der Zerfall der Enzym-Substrat-Zwischenverbindung, ist deren Dissoziationskonstante für Km ausschlaggebend.

Zur Bestimmung von Vmax und Km werden verschiedene Umformungen der Michaelis-Menten-Gleichung benutzt:

Lineweaver-Burk-Diagramm: $\frac{1}{v} = \frac{Km}{Vmax} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{Vmax}$

Eadie-Diagramm: $\frac{S}{v} = \frac{1}{Vmax} \cdot S + \frac{Km}{Vmax}$

Hofstee-Diagramm: $v = - Km \cdot \frac{v}{S} + Vmax$ (11)

In diesen Umformungen wird die vorher gefundene Hyperbel der Michaelis-Menten-Gleichung zu Geraden transformiert, aus deren Steigung und Schnittpunkte mit den Koordinatenachsen Vmax und Km abgelesen werden können.

Wird ein kompetitiver Inhibitor der Enzymreaktion in das System eingeführt, so wird die Anfangsgeschwindigkeit der Enzym-katalysierten Reaktion bei gleicher Substratkonzentration geringer, und damit "Km" größer. Dieses "Km" wird bei Anwesenheit eines Inhibitors Kp genannt. Als Kennzeichen einer kompetitiven Hemmung bleibt jedoch die erreichbare Maximalgeschwindigkeit (Vmax) gegenüber der ungehemmten Reaktion gleich.

Bezeichnet man Ki als die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes und I als die Konzentration des Inhibitors, so erhält man folgende modifizierte Gleichung:

$$v = \frac{Vmax \cdot S}{S + Kp}$$

$$Kp = Km \cdot (1 + \frac{I}{Ki})$$

$$v = \frac{Vmax \cdot S}{S + Km \cdot (1 + \frac{I}{Ki})}$$

I -- molare Inhibitorkonzentration

Ki -- Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes

In ähnlicher Weise wie vorher läßt sich auch diese modifizierte Michaelis-Menten-Gleichung als Gerade darstellen, und die charakteristischen Größen können bestimmt werden.

4.2.2.2. Spaltung von Hexobendin

Die Ergebnisse der Spaltung von Hexobendin in verdünntem Meerschweinchenplasma wurden nach Lineweaver-Burk als reziproke Darstellung aufgetragen (Abb.6), wobei sich der Zusatz von Reserpin in einer signifikanten Zunahme der Steigung

der Geraden äußerte (Tab.1a). Um zu prüfen, ob der geringe Unterschied zwischen den beiden Vmax nur zufallsbedingt ist - wie es für eine kompetitive Hemmung gefordert wird - wurden auch die Geraden in einer S/v gegen S - Auftragung (Eadie-Diagramm) errechnet (Tab.1a) und dann auf Parallelität geprüft (113). Dabei erwies sich der Unterschied zwischen den beiden Steigungen (1/Vmax) mit einem F-Wert von 0,037 als nicht signifikant ($p > 0,05$). Es kann also angenommen werden, daß Reserpin für die Esterspaltung von Hexobendin im Meerschweinchenplasma einen kompetitiven Inhibiter darstellt.

Da sich die Steigungen der beiden Geraden bei der S/v gegen S -Auftragung nicht signifikant unterscheiden, dürfen die beiden Regressionen als parallel angesehen werden (113). Die beiden Regressionskoeffizienten können deshalb durch den gemeinsamen Regressionskoeffizienten b = 0,24 ersetzt werden, was einem theoretisch auf unverdünntes Plasma umgerechneten Vmax von $4,2 \cdot 10^{-4}$ $M.l^{-1}.min^{-1}$ entspricht (Tab.1b).

Der Km-Wert für die Esterspaltung von Hexobendin im Meerschweinchenplasma beträgt 6,7 bzw. $7,8.10^{-5}$ $M.l^{-1}$, je nach Berechnungsart (Tab.1b). Damit liegt er unter den Km-Werten für die Spaltung von Methylbutyrat (11,21,30) durch verschiedene Carboxylesterasepräparate, jedoch in der gleichen Größenordnung wie die Km-Werte für die Hydrolyse von Atropin (115) und Tropacocain (158).

Der Ki-Wert von 1,4 bzw. $2,3.10^{-5}$ $M.l^{-1}$ für Reserpin liegt zwar in der gleichen Größenordnung aber etwas niedriger als der Km-Wert.

4.3. BINDUNG UND SPALTUNG

Bei Angebot von 1 µg/ml Hexobendin sind im Meerschweinchenplasma nur 9,5 % als freie Substanz vorhanden (Abb.5), was einer freien Konzentration von $1,4.10^{-7}$ M/L entspricht. Setzt man 10 µg/ml Hexobendin dem Plasma zu, so liegen 19 % nicht proteingebunden vor (Abb.5) entsprechend einer freien Konzentration von $2,8.10^{-6}$ M/l. Diese ist um den

Faktor 20 höher als vorher, während die Gesamtkonzentration nur 10-fach erhöht wurde.

Beide freien Konzentrationen liegen weit unterhalb des Km-Wertes für die Spaltung von Hexobendin. In diesem Bereich nimmt die Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Spaltung fast noch proportional der Substratkonzentration zu. Die Spaltungsgeschwindigkeit wird also im Falle der höheren Konzentration (10 µg/ml) fast 20mal so groß sein wie bei der niedrigen Konzentration (1 µg/ml), und erst nach Spaltung von 90 % des Angebotes auf den Wert der Spaltungsgeschwindigkeit der Hexobendinspaltung bei 1 µg/ml abgesunken sein, wenn man vom Einfluß der entstandenen Spaltprodukte absieht. Die Geschwindigkeit der Hexobendinspaltung bei Angebot von 1 µg/ml wird vom anfänglichen Wert rasch absinken, da bei abnehmender Konzentration die Proteinbindung zunimmt und die freie Konzentration zusätzlich verringert wird.

Dadurch wird bei der Konzentration von 10 ug/ml Hexobendin ungefähr 15mal mehr gespalten, während die Gesamtkonzentration nur um den Faktor 10 erhöht wurde. Die prozentuell gespaltene Menge nimmt zu und das nach 3 min noch unveränderte Hexobendin in Prozent des Gesamtangebotes ist signifikant erniedrigt (Abb.3a).

Bei weiterer Erhöhung der Substratkonzentration oder Zugabe eines Inhibitors wird die Geschwindigkeitszunahme immer geringer, um asymptotisch Vmax zu erreichen. Bei einem Angebot von 100 µg/ml Hexobendin zugleich mit 10^{-4} M/l Reserpin ist das Enzym zu einem hohen Grad gesättigt. Die freie Konzentration von Hexobendin beträgt 8.10^{-5} M/l, die von Reserpin 5.10^{-5} M/l (Eiweißbindung mit 50 % angenommen entsprechend den Überlegungen im Abschnitt 3.2.1.2.), wodurch Km überschritten und Ki fast erreicht ist. So geschieht es, daß trotz großer Erhöhung der freien Konzentration von Hexobendin gegenüber den Verhältnissen bei einer Gesamtkonzentration von 10 µg/ml Hexobendin die Spaltungsgeschwindigkeit nur wenig zunimmt. Die Zunahme der absolut gespaltenen Menge ist geringer als die Erhöhung der Gesamtkonzentration, dadurch kommt es zu einer Abnahme der prozentuell gespaltenen Menge.und es wird prozentuell mehr unverändertes Hexobendin am Ende des Versuches wiedergefunden (Abb.3b).

So bestimmen die enzymatisch inaktiven Plasmaproteine durch Bindung von Substanzen deren frei Konzentration und damit die Höhe der Anfangsgeschwindigkeit des enzymatischen Abbaus. Andererseits bilden sie ein Depot zur Nachlieferung von Substrat und bewirken ein verlangsamtes Absinken der Spaltungsgeschwindigkeit von ihrem Anfangswert.

Ähnliche Ursachen sind zur Erklärung des Plasmaspiegels von Phenylbutazon nach Ganztierversuchen diskutiert worden (18, 22). Auch hier war eine "Aktivierung" des Umsatzes zu beobachten. Bei Gabe höherer Dosen von Phenylbutazon stieg der Plasmaspiegel nicht proportional der verabreichten Menge, wie erwartet werden war, sondern strebte einem Plateauwert zu; die Metabolisierungsrate wurde deutlich erhöht. Dieser Effekt wurde ebenfalls dadurch erklärt, daß bei höherer Konzentration die Eiweißbindung abnimmt und nun mehr Substanz für den enzymatischen Angriff zur Verfügung steht.

Die vorliegenden Befunde zeigen, daß in vivo und in vitro die Metabolisierung einer Substanz durch ihre Plasmaproteinbindung beeinflußt wird. Bei höherer Dosierung kommt es durch Verminderung der Eiweißbindung und damit Erhöhung der freien Konzentration zu einer Steigerung des Metabolismus über das Maß hinaus, wie es nach Erhöhung der Dosierung zu erwarten wäre. Dadurch nimmt der Plasmaspiegel nicht entsprechend der Dosierung sondern geringer zu.

Ähnliche Verhältnisse können durch gleichseitige Verabreichung einer zweiten Substanz erzielt werden. Wenn die Verdrängung der ersten Substanz aus ihrer Plasmaproteinbindung die Hemmung ihres Abbaues überwiegt, wird ein rascheres Absinken des Plasmaspiegels durch beschleunigten Abbau zu erwarten sein.

5. METHODISCHER TEIL

Die Versuche wurden mit Meerschweinchenplasma durchgeführt. Zur Gewinnung von Plasma wurde an narkotisierten Meerschweinchen (Gewicht: 300-400 g; Chloräthylnarkose) der Thorax eröffnet. Durch Punktion der Herzkammern wurde nach Gabe von 1 mg/kg Heparin Blut entnommen. Für eine Versuchsreihe wurde das Blut von 3-4 Tieren gepoolt. Durch nachfolgendes Zentrifugieren wurde das Plasma abgetrennt, welches gleich anschließend für den jeweiligen Versuch verwendet wurde, um einen eventuellen Einfluß durch Alterung auszuschließen (106,144).

5.1. PLASMAPROTEINBINDUNG

5.1.1. Experimentelle Bestimmung

Die Abbildung 12 veranschaulicht die hier verwendete Modifikation der Sephadex-Gelfiltration (35,47). Die Versuchsapparatur besteht aus einem Röhrchen mit einer am unteren Ende eingeschmolzenen Fritte (G-2), das sich in ein Zentrifugenglas einsetzen läßt. Ein Ring aus Hart-PVC sorgt für eine gleichmäßige Druckübertragung beim Zentrifugieren. Ohne diesen Ring wurden die Glaseinsätze zerstört.

Für die erforderliche Trennung von Hexobendin mit dem Molekulargewicht von 666 und Plasmaproteinen wurde Sephadex G-25 Fine (Ausschlußmolekulargewicht 5000) verwendet, welches in physiologischer Kochsalzlösung in einem Verhältnis von 1 g Sephadex auf 6 ml NaCl-Lösung vorgequollen wurde. 1 ml dieser Sephadex-Suspension entspricht 0,16 g trockenes Sephadex.

1 ml Sephadex-Suspension wurde in das Röhrchen mit Fritte pipettiert und anschließend bei 3000 U/min 3 min lang zentrifugiert. Dabei wurden ca 0,6 ml NaCl-Lösung wieder abgeschleudert, die sich außerhalb der Sephadex-Moleküle befanden ("äußeres Volumen"(35)), während die Sephadexporen mit NaCl-Lösung gefüllt bleiben ("inneres Volumen"(35)).

Versuchsanordnung zur
Bestimmung der Proteinbindung :

Röhrchen mit eingeschmolzener Fritte
Schutzring aus PVC
Zentrifugenröhrchen

(Abmessungen in mm)

Abb.12: Versuchsanordung zur Bestimmung der Plasmaproteinbindung

Zu 2,7 ml Plasma bzw. mit physiolog. NaCl-Lösung verdünnter Plasmalösung oder 0,9 % NaCl-Lösung wurden 0,3 ml physiolog. Kochsalzlösung hinzugefügt, in denen die benötigte Menge an ^{14}C-markiertem Hexobendin gelöst war. Bei den Versuchen mit Reserpin wurden 180 µg in 0,075 ml gelöst dazugegeben und damit eine Konzentration von 10^{-4} M/l eingestellt. Nach Durchmischung wurden 0,2 ml zur ^{14}C-Bestimmung als Maß für die Gesamtkonzentration abpipettiert und die restlichen 2,8 ml dem vorher zentrifugierten Sephadex zugegeben. Nach kurzem Aufrühren wurde bei 3000 U/min 3 min lang zentrifugiert. Das von Plasma getrennte Sephadex wurde in 2 ml physiolog. NaCl-Lösung aufgeschwemmt und 1 ml als Maß für die freie Konzentration zur ^{14}C-Bestimmung abpipettiert. Die Versuche wurden bei Zimmertemperatur (ca 20°C) durchgeführt.

Um die apparativen Fehler möglichst einzuschränken, wurde neben jeder Plasmabestimmung auch eine Kontrolle mit physiolog. Kochsalzlösung unter sonst völlig gleichen Bedingungen durchgeführt (108).

5.1.2. Berechnung

Die Gesamt- und die freie Konzentration sind den Hexobendinmengen im Ansatz znd im Sephadex proportional:

$$\frac{C_{ges}}{C_{frei}} = F.\frac{H_{Ansatz}}{H_{Seph}}$$

F — Proportionalitätsfaktor

H_{Ansatz} — Hexobendin im Ansatz

H_{Seph} — Hexobendin im Sephadex

In einer physiolog. Kochsalzlösung ist, da bindende Proteine fehlen:

$$C_{ges} = C_{frei}$$

Dadurch ist die Berechnung des Proportionalitätsfaktors (F) aus den gemessenen Werten in NaCl-Lösung möglich:

$$1 = F.\frac{H_{Ansatz}}{H_{Seph}}$$

In der Tab.2 sind die F-Faktoren für verschiedene Hexobendinkonzentrationen und in Anwesenheit von Reserpin angegeben.

Tab.2: Proportionalitätsfaktoren (F) zur Berechnung der Plasmaproteinbindung

Mittelwerte und Standardabweichungen

F — Proportionalitätsfaktor
n — Anzahl der Einzelbestimmungen
R — Index bei den Werten mit Reserpin 10^{-4} M/l

Hexobendingesamtkonzentration (µg/ml)	n	F ± SD	F_R ± SD	n_R
0,5	15	0,77 ± 0,07		
1	9	0,77 ± 0,06	0,83 ± 0,03	5
5	14	0,76 ± 0,04		
10	5	0,73 ± 0,03	0,79 ± 0,07	5
50	14	0,74 ± 0,03		
100	5	0,72 ± 0,02	0,72 ± 0,01	5
500	16	0,70 ± 0,03		
5000	8	0,60 ± 0,03		

Da C_{ges} bekannt ist, läßt sich im Plasma aus der ersten Gleichung C_{frei} und ebenso C_{geb} berechnen, nachdem die anderen Größen der Gleichung bestimmt worden sind:

$$C_{frei} = \frac{C_{ges} \cdot H_{Seph}}{F \cdot H_{Ansatz}}$$

$$C_{ges} = C_{geb} + C_{frei}$$

$$C_{geb} = C_{ges} \cdot (1 - \frac{H_{Seph}}{F \cdot H_{Ansatz}})$$

5.1.3. Kritische Betrachtung der modifizierten Sephadex-Gelfiltration

Die herkömmlichen Methoden zur Bestimmung der Eiweißbindung sind die Gleichgewichtsdialyse, Ultrazentrifugation, Ultrafiltration und Gelfiltration. Der Abbau von Hexobendin im Meerschweinchenplasma geht jedoch in Minuten vor sich, sodaß eine rasche Bestimmung gefunden werden mußte, nachdem die anderen Methoden zu ihrer Durchführung Stunden bis Tage benötigen.

Die Beschleunigung der Sephadex-Gelfiltration durch Anlegen eines Vakuums (63,108,149) war eine Möglichkeit. Als zweite Möglichkeit bot sich die Zentrifugationstechnik bei der Gelfiltration an, wie sie zum Entsalzen oder Konzentrieren von Lösungen von Makromolekülen mit einer Korbzentrifuge angewendet wird (35). Das zweite Verfahren wurde gewählt, wobei durch Verwendung kleiner Zentrifugengefäße (Abb.12) das benötigte Plasmavolumen sehr klein gehalten werden konnte. Von FLODIN (47) wurde allerdings für einen anderen Zweck ein dem Prinzip nach ähnliches Verfahren angegeben, wo als Siebplatte ein spezielles Nylongewebe verwendet worden war, während von uns Glasfritten benützt wurden.

Sephadex ist ein Polysaccharid, das durch Vernetzung von Dextranmolekülen erhalten wird. Nach dem verschiedenen Grad der Vernetzung kann man Sephadex-Typen von unterschiedlicher Porengröße, d.h. von unterschiedlichem Ausschlußmolekular-

gewicht erhalten. Infolge der Sephadex-Struktur können je nach Porengröße, d.h. Vernetzungsgrad, Substanzen bis zu einer Grenzmolekülgröße in diese Poren hineindiffundieren, während größere Moleküle, wie Plasmaproteine, nicht dazu in der Lage sind. Diese Möglichkeit, niedermolekulare von Hochmolekularen Stoffen zu trennen (58,130,131), wurde seit der Entwicklung von Sephadex für die Trennung niedermolekularer Substanzen von ihren Komplexen mit Eiweißkörpern verwendet (10,28,35,46,61,63,67,69,89,108,120,132,134,149,153,157,165, 173,174,179).

Zur Bestimmung des Proportionalitätsfaktors (F) wurde eine Kontrolle ohne Protein mit physiolog. NaCl-Lösung durchgeführt. Bei Berücksichtigung der für Sephadex G-25 Fine charakteristischen Wasseraufnahme (35,108, durch eigene Versuche bestätigt) läßt sich für den Fall eines völligen Konzentrationsausgleiches zwischen angebotener Lösung und "innerem Volumen" (Wassermenge im Sephadex nach Zentrifugation) 0,77 als Proportionalitätsfaktor für die angegebenen Versuchbedingungen errechnen. Er stimmt mit den gemessenen Werten der Tab.2 gut überein. Eine Adsorption (52), wie sie für Hormone (120,134,157,173) und Fermente (174), aber auch für Pharmaka (89,108) beschrieben wurden, ist bei Hexobendin auf keinen Fall in großem Ausmaß gegeben.

Es fällt aber auf, daß mit steigender Hexobendinkonzentration der F-Faktor von 0,77 auf 0,6 absinkt, d.h. der zur Verfügung stehende Lösungsraum erscheint geringer als dem inneren Volumen des Sephadex entsprechen würde. Es wäre möglich, daß ein Teil des inneren Volumens als Hydratationswasser des Sephadex nicht als Lösungswasser für Hexobendin zur Verfügung steht. Eine geringe Adsorption bei niedriger Konzentration gleicht den Proportionalitätsfaktor an den errechneten Wert an, fällt aber bei höherer Konzentration nicht mehr ins Gewicht, sodaß der Faktor absinkt.

Ein geringer Fehler kommt bei dieser Art der Eiweißbindungsbestimmung zustande, daß noch etwas Protein am Sephadex haften bleibt (108). Eine Bestimmung des Proteingehaltes im Sephadex nach Zentrifugation nach LOWRY et al. (114) ergab, daß dieser Fehler höchstens mit 2 % anzusetzen ist. Er wurde deshalb vernachlässigt.

5.2. ESTERSPALTUNG VON HEXOBENDIN

Die Bestimmungen wurden in einem Wasserbad bei 37°C durchgeführt. Der zeitliche Ablauf der Spaltung im Meerschweinchenplasma wurde mit folgendem Ansatz bestimmt (Abschnitt 3.1.1.1.): 9 ml Plasma wurden mit 1 ml physiolog. Kochsalzlösung gemischt, der 10 µg/ml ^{14}C-Hexobendin enthielt; dadurch war eine Ausgangskonzentration von 1 µg/ml Hexobendin hergestellt. Zu den angegebenen Zeiten (30 sec, 3, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 min) wurde 1 ml abpipettiert und mit 2 ml Methanol kräftig gemischt, um die enzymatische Spaltung abzubrechen. Dem Methanol waren vorher Hexobendin, Halbester und Trimethoxybenzoesäure als unmarkierte Referenzsubstanz zugegeben worden. 1 ml wurde zur chromatographischen Bestimmung verwendet.

Die enzymkinetischen Untersuchungen (Abschnitt 3.2.2.) wurden folgendermaßen vorgenommen: 0,1 ml verdünntes Plasma (1 Teil Plasma + 4 Teile physiolog. NaCl-Lösung) wurden mit 0,9 ml Phosphatpuffer (1/15 molar, pH 7,4) versetzt. Anschließend wurde 1 ml physiolog. Kochsalzlösung hinzugefügt, welcher ^{14}C-Hexobendin in den Konzentrationen von 20, 30, 60 und 200 µg/ml enthielt. Damit wurden in einer 1:100 verdünnten Plasmalösung Hexobendinkonzentrationen von 10, 15, 30 und 100 µg/ml erzielt. Die Esterspaltung erfolgte im untersuchten Zeitbereich mit einem maximalen Konzentrationsabfall von 20 %. Bei den Versuchen mit Reserpin wurden 12 µg in 0,05 ml gelöst hinzugefügt und damit eine Reserpinkonzentration von 10^{-5} M/l eingestellt. Nach einer Inkubation von 5 min bei 37°C wurden 2 ml Methanol mit Hexobendin und seinen Abbauprodukten als unmarkierte Vergleichssubstanz hinzupipettiert, um die Reaktion zum Stillstand zu bringen. 1 ml wurde der chromatographischen Bestimmung zugeführt.

Um den Einfluß der Eiweißbindung auf die Abbaurate zu untersuchen (Abschnitt 3.1.1.2. und 3.2.3.), wurden 3,6 ml Plasma mit 0,4 ml physiolog. NaCl-Lösung bei 37°C inkubiert, die 10, 100 und 1000 µg/ml ^{14}C-Hexobendin enthielten. Dadurch wurden im Versuchsansatz Konzentrationen von 1, 10 und 100 µg/ml Hexobendin erstellt. Bei den Versuchen mit Reserpin wurden 240 µg in 0,1 ml gelöst hinzugefügt und dadurch eine Reserpin-

konzentration von 10^{-4} M/l erreicht. Nach 3 min wurde 1 ml abpipettiert und mit 2 ml Methanol mit unmarkierten Vergleichssubstanzen gemischt, um die Spaltung zu unterbrechen. Davon wurde 1 ml der chromatographischen Bestimmung zugeführt.

5.3. CHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG VON HEXOBENDIN UND SEINEN SPALTPRODUKTEN

Die Auftrennung von Hexobendin und seinen Spaltprodukten erfolgte dünnschichtchromatographisch im Überstand nach Zugabe von Methanol, welchem Hexobendin und seine Spaltprodukte, Halbester und Trimethoxybenzoesäure, zugesetzt waren. Es wurden vorgefertigte Aluminiumfolien mit einer Kieselgel-Schicht mit Fluoreszenzindikator (DC-Karten Sl F, RIEDEL DE HAEN, Hannover) verwendet. Als Laufmittel für die aufsteigende Chromatogrphie diente eine Mischung von Butanol: Methyläthylketon:Aceton:Ammoniak(33%):Aqua dest. im Verhältnis 40:40:25:8:13 (164). Die Laufzeit für eine Laufstrecke von ca 8 cm betrug ca 60 min. Die Auftragung von 1 ml erfolgte mit einem Autoliner (DESAGA, Heidelberg). Unter den angegebnen Chromatographie-Bedingungen erhält man für Hexobendin einen Rf-Wert von 0,9, für den Halbester von 0,6 und für die Trimethoxybenzoesäure von 0,3.

Die Bestimmung selbst erfolgte mit Hilfe einer Trägeranalyse, d.h. daß die Zonen durch Zugabe von unmarkierter Referenssubstanz zum Methanol unter Ausnutzung der UV-Absorption sichtbar gemacht wurden. Die UV-absorbierenden Areale wurden nach Markierung unter einer UV-Lampe von der Platte geschabt und unter Zugabe von 1 ml Methanol der radiometrischen Bestimmung zugeführt.

5.4. RADIOMETRISCHE BESTIMMUNG

Zur Messung der ^{14}C-Aktivität wurde allen Proben 10 ml BRAY'sche Scintillatorflüssigkeit (15) mit folgender Zusammensetzung zugefügt: 300 g Naphthalin, 20 g 2,5-Diphenyloxazol, 1 g 1,4-Bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol, 4,4 l Dioxan, 500 ml Methanol und 100 ml Äthylenglykol.

Alle Proben wurden 10 min mit einem Tri-carb Liquid Scintillation Spectrometer (PACKARD, Illinois) gemessen. Die notwendigen Berechnungen auf erhaltene Mengen oder Konzentrationen erfolgte mit der jeweils zu Versuchsbeginn eingesetzten spezifischen Aktivität.

5.5. VERWENDETE SUBSTANZEN

Hexobendin wurde ^{14}C-markiert und als unmarkierte Substanz ebenso wie die Spaltprodukte, Halbester und Trimethoxybenzoesäure, von der Herstellerfirma (CHEMISCHE INDUSTRIE PHARMAZEUTISCHE AG, Linz a. Donau) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Hexobendin ist das Dihydrochlorid des N,N'-Dimethyl-N,N'-bis-(3-(3',4',5'-trimethoxybenzoxy)-propyl)-äthylendiamins. Die Markierung mit ^{14}C war an den beiden Carboxygruppen der Trimethoxybenzoesäureester durchgeführt. Als markierte Spaltprodukte eines esteratischen Abbaues erhält man bei nur halbseitiger Hydrolyse die im Text als "Halbester" bezeichnete Substanz und außerdem die Trimethoxybenzoesäure. Die Abb.1 zeigt die chemischen Strukturformeln der genannten Substanzen.

Als Heparinlösung wurde eine Lösung von Heparin-Natrium (SERVA, Heidelberg) 1 mg/ml in physiolog. Kochsalzlösung benutzt.

Bei den Versuchen mit Reserpin wurde Serpasil^{R} (CIBA, Basel) mit 2,5 mg Reserpin/ml verwendet, das für die enzymkinetischen Untersuchungen (Abschnitt 5.2.) noch 1:10 mit physiolog. NaCl-Lösung verdünnt wurde.

Sephadex^{R} G-25 Fine wurde von PHARMACIA, Uppsala bezogen.

6. LITERATUR

1 ADAMS D.H. and WHITTAKER V.P.: The cholinesterases of human blood. II. The forces acting between enzyme and substrate. Biochim.Biophys.Acta, 4,(1950):543-558

2 ADLER A.J. and KISTIAKOWSKY G.B.: Isolation and properties of pig liver esterase. J.Biol.Chem., 236,(1961):3240-3245

3 ALDRIDGE W.N.: Serum esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. Biochem.J., 53,(1953):110-117

4 ANTON A.H.: The relation between the binding of sulfonamides to albumin and their antibacterial efficacy. J.Pharmacol.Exp.Ther., 129,(1960):282-290

5 ANTON A.H.: A drug-induced change in the distribution and renal excretion of sulfonamides. J.Pharmacol.Exp.Ther., 134,(1961):291-303

6 ANTON A.H. and BOYLE J.J.: Alteration of the acetylation of sulfonamides by protein binding, sulfinpyrazone and suramin. Can.J.Physiol.Pharmacol., 42,(1964):809-817

7 AUGUSTINSSON K.B.: Cholinesterases. A study in comparative enzymology. Acta Physiol.Scand., 15,Suppl.52,(1948): 1-181

8 AUGUSTINSSON K.B.: Butyryl- and propionylcholinesterases and related types of eserine-sensitive esterases.
In "The enzymes" (Boyer P.D., Lardy H., Myrbäck K. eds.), Vol.4, 521-540, Academic Press, New York and London 1960

9 AUGUSTINSSON K.B.: Multiple forms of esterase in vertebrate blood plasma.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 94,(1961):844-860

10 BARLOW C.F., FIREMARK H. and ROTH L.J.: Drug-Plasma binding measured by sephadex.
J.Pharm.Pharmacol., 14,(1962):550-555

11 BARMAN T.E.: Enzyme Handbook. Vol.1
Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York 1969

12 BARMAN T.E.: Enzyme Handbook. Vol.2
Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York 1969

13 BENNETT J.V. and KIRBY W.M.M.: A rapid, modified ultrafiltration method for determining serum protein binding and its application to new penicillins.
J.Lab.Clin.Med., 66,(1965):721-732

14 BIRD A.E. and MARSHALL A.C.: Correlation of serum binding of penicillins with partition coefficients.
Biochem.Pharmacol., 16,(1967):2275-2290

15 BRAY G.A.: A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter.
Anal.Biochem., 1,(1960):279-285

16 BRODIE B.B. and HOGBEN A.M.: Some physico-chemical factors in drug action.
J.Pharm.Pharmacol., 9,(1957):345-380

17 BRODIE B.B.: Physicochemical factors in drug absorption. In "Absorption and distribution of drugs" (Binns T.B. ed.), 16-48, E.S. Livingstone Ltd., London 1964

18 BRODIE B.B.: Distribution and fate of drugs; therapeutic implications. In "Absorption and distribution of drugs" (Binns T.B. ed.), 199-251, E.S. Livingstone Ltd., London 1964

19 BRODIE B.B.: Displacement of one drug by another from carrier or recepter sites. Proc.Roy.Soc.Med., 58,(1965):946-955

20 BÜNGER P., DILLER W., FÜHR J. und KRÜGER-THIEMER E.: Vergleichende Untersuchungen an neueren Sulfonamiden. Arzneim.-Forsch., 11,(1961):247-255

21 BURCH J.: The purification and properties of horse liver esterase. Biochem.J., 58,(1954):415-426

22 BURNS J.J., ROSE R.K., CHENKIN T., GOLDMAN A., SCHULERT A. and BRODIE B.B.: The physiological disposition of phenylbutazone (butazolidin) in man and a method for its estimation in biological material. J.Pharmacol.Exp.Ther., 109,(1953):346-357

23 BÜTTNER H. and PORTWICH F.: Metabolic processes influencing the pharmacokinetics of sulfonamides. Antimicrobial Agents and Chemotherapy - 1965, 177-179, Amer.Soc.Microbiol., Ann Arbor, Michigan

24 BÜTTNER H. und PORTWICH F.: Kompetitionsphänomene bei der Bindung von Pharmaka an Albumin. Klin.Wschr., 45,(1967):225-230

25 CAMPION D.S. and NORTH J.D.K.: Effect of protein binding of barbiturates on their rate of removal during peritoneal dialysis. J.Lab.Clin.Med., 66,(1965):549-563

26 CHIGNELL C.F.: Optical studies of drug-protein complexes. II. Interaction of phenylbutazone and its analogues with human serum albumin. Mol.Pharmacol., 5,(1969):244-252

27 CHRISTENSEN L.K., HANSEN J.M. and KRISTENSEN M.: Sulphaphenazol-induced hypoglycaemic attacks in sulbutamide-treated diabetes. Lancet,II,(1963):1298-1301

28 CLAUSEN J.: Binding of sulfonamides to serum proteins physicochemical and immunochemical studies J.Pharmacol.Exp.Ther., 153,(1966):167-175

29 CONN H.L. and LUCCHI R.J.: Ionic influences on quinidine-albumin interaction. J.Pharmacol.Exp.Ther., 133,(1961):76-83

30 CONNORS W.M., PHIL A., DOUNCE A.L. and STOTZ E.: Purification of liver esterase. J.Biol.Chem., 184,(1950):29-36

31 DAUGHADAY W.H.: Steroid protein interactions. Physiol.Rev., 39,(1959):885-902

32 DAVIES B.D. and WOOD W.B.: Studies on antibacterial action of sulfonamide drugs. III. Correlation of drug activity with binding to plasma proteins. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 51,(1942):283 - 285

33 DAVIES B.D.: The binding of sulfonamide drugs by plasma proteins. A factor in determining the distribution of drugs in the body. J.Clin.Invest., 22,(1943):753-762

34 DAVISON C. and SMITH P.K.: The binding of salicylic acid and related substances to purified proteins. J.Pharmacol.Exp.Ther., 133,(1961): 161-170

35 DETERMANN H.: Gelchromatographie. Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York 1967.

36 DETTLI L.: Der Konzentrationsbegriff in der Chemotherapie mit Sulfonamiden. Arzneim.-Forsch., 11,(1961):861-866

37 DETTLI L. und SPRING P.: Zur Verteilung des Sulfonamids 2-Sulfa-3-methoxypyrazin (SMP) zwischen Serum und Liquor cerebrospinalis des Menschen. Helv.Physiol.Acta, 22,(1964):C 112-114

38 DETTLI L. and SPRING P.: Pharmacokinetics as a basic medical problem. In "Physicochemical aspects of drug action" (Ariens E.J. ed.), Proc. of the third intern. pharmacol. meeting, Vol.7, 5-32, Pergamon Press 1968

39 DICARLO F.J., MALAMENT S.G., HAYNES L.J. and PHILLIPS G.E.: Metabolism of N-(2-Methyl-6-methoxy-4-pyrimidinyl)sulfanilamide (sulfamethomidine) in the rat, the rabbit and the dog. Toxicol.Appl.Pharmacol., 4,(1962):475-488

40 DIXON M. and WEBB E.C.: Enzymes. Spottiswoode, Ballantyne and Co. Ltd., London and Colchester 1958

41 DIXON R.L., HENDERSON E.S. and RALL D.P.: Plasma protein binding of methotrexate and its displacement by various drugs. Fed.Proc., 24,(1965):454

42 DOST F.H.: Grundlagen der Pharmakokinetik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1968

43 DOUGLAS J.F., BRADSHAW W.H., LUDWIG B.J. and POWERS D.: Interaction of plasma protein with related 1,3-propanediol dicarbamates. Biochem.Pharmacol., 13,(1964):537-539

44 DUNCAN L.J.P. and CLARKE B.F.: Pharmacology and mode of action of the hypoglycaemic sulphonylureas and diguanides. Ann.N.Y.Acad.Sci., 5,(1965):151-162

45 FISCHER J.J. and JARDETZKY O.: Nuclear magnetic relaxation study of intermolecular complexes. The mechanism of penicillin binding to serum albumin. J.Amer.Chem.Soc., 87,(1965):3237-3244

46 FLODIN P.: Methodological aspects of gel filtration with special reference to desalting operations. J.Chromatog., 5,(1961):103-115

47 FLODIN P.: Dissertation, Uppsala 1962. cit. nach Determann (36)

48 FRANKE R.: Die hydrophobe Wechselwirkung von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen mit Humanserumalbumin. Biochim.Biophys.Acta, 160,(1968): 378-395

49 FREDERICQ E.: Interactions de proteines et d'ions en solution. 1. Influences de structure dans les associations entre proteines et anions organiques. Bull.Soc.Chim.Belg., 63,(1954):158-181

50 FREDERICQ E.: Interactions de proteines et d'ions en solution. 2. Energie d'association de la serumalbumine et d'anions organiques. Bull.Soc.Chim.Belg., 64,(1955):639-657

51 GARN F.W. und KIMBEL K.H.: Verbleib und Ausscheidung von Depot-Sulfonamiden. 1.Mitt.: Bindung an Plasmaeiweiß.
Arzneim.-Forsch., 11,(1961):701-707

52 GELOTTE B.: Studies on gel filtration. Sorption properties of the bed material sephadex.
J.Chromatog., 3,(1960?:330-342

53 GENAZZANI E., BONONI L.J., PAGNINI G. and DICARLO R.: Competition between sulfonamides and tetracyclines in the binding with serum proteins.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy - 1965, 192-196, Amer.Soc.Microbiol., Ann Arbor, Michigan

54 GENAZZANI E., PAGNINI G. and DICARLO R.: Influence of different drugs on the sulfonamides serum binding and on sulfonamide aqueous humor levels.
In "Physicochemical aspects of drug action" (Ariens E.J. ed.), Proc. of the third intern. pharmacol. meeting, Vol.7, 181-187, Pergamon Press 1968

55 GLICK D. and GLAUBACH S.: The occurence and distribution of atropinesterase, and the specifity of tropinesterases.
J.Gen.Physiol., 25,(1941):197-205

56 GOLDBAUM L.R. and SMITH P.K.: The interaction of barbiturates with serum albumin and its possible relation to their disposition and pharmacological actions.
J.Pharmacol.Exp.Ther., 111,(1954):197-209

57 GOLDSTEIN A.: The interactions of drugs and plasma proteins.
Pharmacol.Rev., 1,(1949):102-165

58 GRANATH K.A. and FLODIN P.: Fractionation of dextran by gel filtration method. Makromol.Chem., 88,(1961):160-171

59 HANSCH C., KIEHS K. and LAWRENCE G.L.: The role of substituents in the hydrophobic bonding of phenols by serum and mitochondrial proteins. J.Amer.Chem.Soc., 87,(1965):5770-5773

60 HANSCH C.: The use of substituent constants in structure-activity studies. In "Physicochemical aspects of drug action" (Ariens E.J. ed.), Proc. of the third Intern. pharmacol. meeting, Vol.7, 141-167, Pergamon Press 1968

61 HARDY T.L. and MANSFELD K.R.L.: Gel filtration as a method of studying drug-protein binding. Biochem.J., 83,(1962):34-35 P

62 HART H.E.: Determination of equilibrium constants and maximum binding capacities in complex in vitro systems: I. The mammillary system. Bull.Math.Biophys., 27,(1965):87-98

63 HATTINGBERG H.M.v. und KLAUS W.: Trennung des proteingebundenen vom frei diffusiblen Calcium im Serum durch Sephadex. Klin.Wschr., 44,(1966):499-503

64 HESS A.R., ANGEL R.W., BARRON K.D. and BERNSOHN J.: Proteins and isozymes of esterases and cholinesterases from sera of different species. Clin.Chim.Acta, 8,(1963):656

65 HILGER H.H.: Experimentelle Prüfung der Wirkung von Coronardilatatoren am Menschen. Arch.Pharmak.exp.Path., 263,(1969): 168-184

66 HOFFMANN-OSTENHOFF O.: Enzymologie. Springer Verlag, Wien 1954

67 HOFMANN P., KRIEGLSTEIN J., KUSCHINSKY G., MUTSCHLER E. und WOLLERT U.: Über die Eiweißbindung von Bisguanylhydrazonen der 4,4'-Diacetyldiphenyl-Reihe in Abhängigkeit von der Struktur. Arch.Pharmak.exp.Path., 260,(1968): 145-146

68 HOFSTEE B.H.J.: Fatty acid esterases of low eserine sensitivity and related enzymes. In "The enzymes" (Boyer P.D., Lardy H., Myrbäck K. eds.), Vol.4, 485-500, Academic Press, New York and London 1960

69 HUMMEL J.P. and DREYER W.J.: Measurement of protein-binding phenomena by gel filtration. Biochim.Biophys.Acta,63,(1962):530-532

70 JÄHNCHEN E., KRIEGLSTEIN J. und KUSCHINSKY G.: Über den Einfluß saurer Substanzen auf die Bindung von Promazin an Rinderserumalbumin. Arch-Pharmak.exp.Path., 260,(1968): 147-148

71 JÄHNCHEN E., KRIEGLSTEIN J. und KUSCHINSKY G.: Die Bedeutung der Benzolringe bei der Eiweißbindung von Promazin und Chlorpromazin. Arch.Pharmak.exp.Path., 263,(1969): 375-386

72 JARDETZKY O. and WADE-JARDETZKY N.G.: On the mechanism of the binding of sulfonamides to bovine serum albumin. Mol.Pharmacol., 1,(1965):214-230

73 JARDETZKY O.: Magnetische Resonanz in der pharmakologischen Forschung. Naturwissenschaften 54,(1967):149-155

74 JOSEPHSON B. and FURST P.: Sulfonamides competing with bilirubin for conjugation to albumin. Scand.J.Clin.Lab.Invest., 18,(1966):51-63

75 KARUSH F.: Heterogeneity of binding sites of bovine serum albumin. J.Amer.Chem.Soc., 72,(1950):2705-2713

76 KARUSH F.: [illegible] interaction of organic anions with bovine serum albumin. [illegible], 72,(19[illegible]):2714-2718

[illegible] KEEN P.M.: The displacement of [illegible] anionic drugs from binding to bovine serum albumin by various anionic compounds. [illegible], [illegible],(19[illegible]):[illegible]

78 KEEN P.M.: The binding of penicillins to bovine serum albumin. [illegible], 11,(19[illegible]):[illegible]

[illegible] KLEIJN E. van der: [illegible] of the [illegible]- and diazepine-group. Arch.int.[illegible], [illegible],(19[illegible]): [illegible]

[illegible]0 KLOTZ I.M., TRIWUSH H. and WALKER M.: The binding of organic ions by proteins. Competition phenomena and denaturation effects. J.Amer.Chem.Soc., 70,(1948):2935-2941

[illegible] KLOTZ I.M. and URQUHART J.M.: The binding of organic ions by proteins. Buffer effects. J.Phys.Colloid.Chem., 53,(1949):100-114

82 KLOTZ I.M. and AYERS J.: Protein interaction with organic molecules. Discuss.Faraday Soc., 13,(1953):189-196

83 KLOTZ I.M.: Protein hydration and behavior. Science, 128,(1958):815-822

84 KOBLET H.: Physikalische Begriffe in der klinischen Biochemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1964

85 KOLASSA N. und PFLEGER K.: Einfluß der Plasmaproteinbindung auf die Aufnahme von Hexobendin in das isoliert schlagende Warmblüterherz. Arch.Pharmak.exp.Path., 264,(1969):258

86 KORTÜM G.: Einführung in die chemische Thermodynamik. Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstrasse 1966

87 KRAUPP O.: Zum Wirkungsmechanismus der Coronardilatatoren. Arch.Pharmak.exp.Path., 263,(1969): 144-155

88 KRIEGLSTEIN J. und KUSCHINSKY G.: Die Bindung einiger Phenothiazinderivate an Rinderserumalbumin. Arch.Pharmak.exp.Path., 260,(1968): 160-161

89 KRIEGLSTEIN J. und KUSCHINSKY G.: Quantitative Bestimmung der Eiweißbindung von Pharmaka durch Gelfiltration. Arzneim.-Forsch., 18,(1968):287-289

90 KRIEGLSTEIN J. und KUSCHINSKY G.: Über die Wechselwirkung von Phenothiazinderivaten mit Rinderserumalbumin. Arch.Pharmak.exp.Path., 262,(1969): 1-16

91 KRIEGLSTEIN J.: Über die Wechselbeziehung der Plasma- und Gewebsproteinbindung von Promazin, untersucht an der isoliert perfundierten Rattenleber. Arch.Pharmak.exp.Path., 262,(1969): 474-483

92 KRÜGER-THIEMER E.: Funktionale Beziehungen zwischen den pharmakokinetischen Eigenschaften und der Dosierung von Chemotherapeutika. Klin.Wschr., 38,(1960):514-520

93 KRÜGER-THIEMER E., WEMPE E. und TÖPFER M.: Die antibakterielle Wirkung des nicht eiweißgebundenen Anteils der Sulfonamide im menschlichen Plasmawasser. Arzneim.-Forsch., 15,(1965):1309-1317

94 KRÜGER-THIEMER E., DILLER W. and BÜNGER P.:
Pharmacokinetic models regarding protein binding of drugs.
[illegible] agents and Chemotherapy 1965, 183-191, Amer.Soc.Microbiol., Ann Arbor, Michigan

95 KRÜGER-THIEMER E.:
[illegible] and dose-concentration relationships.
In "[illegible] aspects of drug action" (Ariens E.J. ed.), Proc. of the [illegible] Intern. pharmacol. meeting, Vol. 63-113, Pergamon Press 1968

96 KUCERA J.L. and BULLOCK F.J.:
The binding of salicylate to plasma protein from several species.
J.Pharm.(Lond.), 21,(1969):293-[illegible]

97 KUNIN C.M.:
[illegible] binding, distribution and excretion of four penicillin analogues following intravenous injection in man.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 107,(1961): 337-341

98 KUNIN C.M.:
Enhancement of antimicrobial activity of penicillins and other antibiotics in human serum by competitive serum binding inhibitors.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 117,(1964): 69-73

99 KUNIN C.M.:
Effect of serum binding on the distribution of penicillins in the rabbit.
J.Lab.Clin.Med., 65,(1965):406-415

100 KUNIN C.M.:
Inhibitors of penicillin binding to serum proteins.
J.Lab.Clin.Med., 65,(1965):416-431

101 KUNIN C.M.:
Therapeutic implications of serum protein binding of the new semisynthetic penicillins.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy - 1965, 1025-1034, Amer.Soc.Microbiol., Ann Arbor, Michigan

102 KUNTZMAN R., TSAI I. and BURNS J.J.: Importance of tissue and plasma binding in determining the retention of norchlorcyclizine and norcyclizine in man, dog and rat. J.Pharmacol.Exp.Ther., 158,(1967): 332-339

103 KURZ H. und FRIEMEL G.: Artspezifische Unterschiede der Bindung an Plasmaproteine. Arch.Pharmak.exp.Path., 257,(1967):35-36

104 KURZ H. und TRUNK H.: Der Einfluß von Phenylbutazon auf die Bindung von Thiopental an Plasmaproteine. Arch.Pharmak.exp.Path., 257,(1967):300

105 KURZ H. und MOHR E.: Der Einfluß von Acidose und Alkalose auf die Bindung von Arzneimitteln an Plasmaproteine. Arch.Pharmak.exp.Path., 260,(1968):164

106 KURZ H. und TRUNK H.: Änderung der Bindungseigenschaften von Plasmaproteinen in Plasmakonserven nach verschiedener Lagerung. Arch.Pharmak,exp.Path., 263,(1968):274

107 KURZ H.: Einfluß der Proteinbindung auf die Verteilung von Arzneimitteln nach schneller und langsamer Injektion. Arch.Pharmak.exp.Path., 263,(1969): 233-234

108 KUSCHINSKY K.: Bestimmung der Eiweißbindung verschiedener Herzglykoside mittels Sephadex-Gelfiltration. Arch.Pharmak.exp.Path., 259,(1968): 394-399

109 KUSCHINSKY K.: Die Bindung verschiedener Herzglykoside an Plasmaproteine. Arch.Pharmak.exp.Path., 260,(1968):165

110 KUSCHINSKY K.: Über die Bindungseigenschaften von Plasmaproteinen für Herzglykoside.
Arch. exper. Pathol. Pharmak., 262,(1969): 388-398

111 KUSCHINSKY K. und van ZWIETEN P.A.: Über das Verhalten von Digoxin, Digitoxin und Digitoxigenin in isolierten Herzgewebe und im Plasma von Meerschweinchen nach Reserpin-Vorbehandlung.
Arch. exper. Pathol. Pharmak., 262,(1969): 463-473

112 LATNER A.L. and SKILLEN A.W.: Isoenzymes in biology and medicine.
Academic Press, London - New York 196

113 LINDER A.: Statistische Methoden.
Birkhäuser Verlag, Basel - Stuttgart 1960

114 LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent.
J.Biol.Chem., 193,(1951):265-275

115 MARGOLIS F. and FEIGELSON P.: Purification and charakterization of a genetically determined rabbit serum esterase.
J.Biol.Chem., 238,(1963):2620-2627

116 MARKUS G. and KARUSH F.: Structural effects of anionic azo dyes on serum albumin.
J.Amer.Chem.Soc., 80,(1958):89-94

117 MARTIN B.K.: Potential effect of the plasma protein on drug distribution.
Nature, 207,(1965):274-276

118 MARTIN B.K.: Kinetics of elimination of drugs possessing high affinity for the plasma proteins.
Nature, 207,(1965):959-960

119 MEYER M.C. and GUTTMAN D.E.: The binding of drugs by plasma proteins. J.Pharm.Sci., 57,(1968):895-918

120 de MOOR P., HEIRWEGH K., HEREMANS J.F. and DECLERCK-RASKIN M.: Protein binding of corticoids studied by gel filtration. J.Clin.Invest., 41,(1962):816-827

121 MYERS D.K.: Studies on cholinesterase. 7. Determination of the molar concentration of pseudo-cholinesterase in serum. Biochem.J., 51,(1952):303-311

122 MYERS D.K.: Carboxyl ester cleavage. In "The enzymes" (Boyer P.D., Lardy H., Myrbäck K. eds.),Vol.4,475-483, Academic Press, New York - London 1960

123 NETTER H.: Theoretische Biochemie. Springer Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg 1959

124 NEWBOULD B.B. and KILPATRICK R.: Long-acting sulphonamides and protein-binding. Lancet, I,(1960):887-891

125 ODELL G.B.: Studies in kernicterus. I. The protein binding of bilirubin. J.Clin.Invest., 38,(1959):823-833

126 PETERS T.: Blut als Inkubationsmedium für isolierte Organe: Pharmakokinetische Untersuchungen mit ^{3}H-markierten Herzglykosiden. Arch.Pharmak.exp.Path., 263,(1969): 242-243

127 PFLEGER K., VOLKNER I. und KOLASSA N.: Hemmung der Aufnahme von Adenosin und Verstärkung seiner Wirkung am isolierten Warmblüterherzen durch coronarwirksame Substanzen. Arzneim.-Forsch., 19,(1969):1972-1974

128 PFLEGER K. und KOLASSA N.: Unveröffentlichte Beobachtungen

129 PILZ W.: Fermente des menschlichen Blutes. XIII. Cholinester-spaltende Fermente des menschlichen Serums. Hoppe Seylers Z.Physiol.Chem., 345, (1966):80-90

130 PORATH J.: Fractionation of polypeptides and proteins on dextran gels. Clin.Chim.Acta, 4,(1959):776-778

131 PORATH J. and FLODIN P.: Gel filtration: a method for desalting and group separation. Nature, 183,(1959):1657-1659

132 PORATH J.: Gel filtration of proteins, peptides and amino acids. Biochim.Biophys.Acta, 39,(1960):193-20

133 PORTWICH F., BÜTTNER H. und ENGELHARDT K.: Nierenausscheidung und Eiweißbindung von Sulfonamiden. Klin.Wschr., 41,(1963):447-451

134 QUINCEY R.V. and GRAY C.H.: A comparison of protein-binding of cortisol as measured by equilibrium dialysis and gel filtration. J.Endocrin., 26,(1963):509-516

135 QUINN E.L., COLVILLE J.M., BALLARD L., JONES D. and DEBNAM F.: Ampicillin: antimicrobial activity and pharmacological behavior with reference to certain gram-positive cocci. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1962, 339-349, Amer.Soc.Microbiol., Ann Arbor, Michigan

136 RIEDER J.: Physikalisch-chemische und biologische Untersuchungen an Sulfonamiden. Arzneim.-Forsch., 13,(1963):81-103

137 ROBINSON G.N. and SUTHERLAND R.: The binding of antibiotics to serum proteins. Brit.J.Pharmacol., 25,(1965):638-650

138 ROSENTHAL H.E.: A graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system. Anal.Biochem., 20,(1967):525-532

139 SARIS N.E.: The effect of dilution on the protein-binding of sulfonamides. Acta med.Scand., 175,(1964):597-598

140 SCATCHARD G.: The attractions of protein for small molecules and ions. Ann.N.Y.Acad.Sci., 51,(1949):660-672

141 SCATCHARD G., SCHEINBERG H. and ARMSTRONG S.H.: Physical chemistry of protein solutions. IV. The combination of human serum albumin with chloride ion. J.Amer.Chem.Soc., 72,(1950):535-540

142 SCHACH v.WITTENAU M., YEARY R.: The excretion and distribution in body fluids of tetracyclines after intravenous administration to dogs. J.Pharmacol.Exp.Ther., 140,(1963): 258-266

143 SCHERMER S.: Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere. J.A. Barth Verlag, Leipzig 1954

144 SCHOLTAN W.: Die Bindung der Langzeit-Sulfonamide an die Eiweißkörper des Serums. Arzneim.-Forsch., 11,(1961):707-720

145 SCHOLTAN W.: Über die Bindung der Langzeitsulfonamide an die Serumeiweißkörper. 1. Mitt. Makromol.Chem., 54,(1962):24-59

146 SCHOLTAN W. und SCHMID J.: Die Bindung der Penicilline an die Eiweißkörper des Serums und des Gewebes. Arzneim.-Forsch., 12,(1962):741-750

147 SCHOLTAN W. und SCHMID J.: Die Bindung der Antibiotica an die Eiweißkörper des Serums. 2. Mitt. Arzneim.-Forsch., 13,(1963):288-294

148 SCHOLTAN W.: Die Bindung der Antibiotica an die Eiweißkörper des Serums. Arzneim.-Forsch., 13,(1963):347-360

149 [illegible]: Vergleichende quantitative Bestimmung der Eiweißbindung von Chemotherapeutica mittels Sephadex und Dialyse. Arzneim.-Forsch., 14,(1964):146-149

150 SCHOLTAN W.: Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper. 3. Mitt.: Abhängigkeit der Eiweißbindung vom pH der Lösung, von der Konstitution der Sulfonamide und von der Art des Eiweißkörpers. Arzneim.-Forsch., 14,(1964):348-356 und 469-673

151 SCHOLTAN W.: Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper. 4. Mitt.: Konzentrations- und Temperaturabhängigkeit der Eiweißbindung Arzneim.-Forsch., 14,(1964):1139-1146

152 SCHOLTAN W.: Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper. 5. Mitt.: Sulfonamid-Bindungsvermögen und optisches Drehungsvermögen der Serumeiweißkörper. Arzneim.-Forsch., 14,(1964):1234-1238

153 SCHOLTAN W.: Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper. 6. Mitt.: Bestimmung der Eiweißbindung von Sulfonamiden mittels der Ultrazentrifuge und Gelfiltration. Arzneim.-Forsch., 15,(1965):1433-1441

154 SCHOLTAN W., SCHEDDSMANN K. und ROSENKRANZ H.: Bestimmung der Eiweißbindung von Digitalis-Präparaten mittels der Ultrazentrifuge. Arzneim.-Forsch., 16,(1966):109-118

155 SCHOLTAN W.: Die hydrophobe Bindung der Pharmaka an Humanalbumin und Ribonucleinsäure. Arzneim.-Forsch., 18,(1968):505-517

156 SCHOLTAN W., SCHLOSSMANN K. und ROSENKRANZ H.: Die Bindung von Steroidhormonen und von Steroidguanylhydrazonen an Serumalbumin. Arzneim.-Forsch., 18,(1968):767-780

157 SCRIBA P.C., LANDGRAF R., HEINZE H.G. und SCHWARZ K.: Bestimmung der Bindung von Trijodthyronin an Serumproteine mittels Dextran-Gel-Filtration. Klin.Wschr., 44,(1966):69-76

158 SEILER N., KAMENIKOVA L. und WERNER G.: Untersuchungen zum Stoffwechsel von Tropan-Alkaloiden. VII. Versuche zur Charakterisierung der Tropacocainesterase. Hoppe Seylers Z.Physiol.Chem., 349, (1968):692-698

159 SEYDEL J.K.: Molecular basis for the action of chemotherapeutic drugs, structure-activity studies on sulfonamides. In "Physicochemical aspects of drug action" (Ariens E.J. ed.), Proc. of the third intern. pharmacol. meeting, Vol.7, 169-180, Pergamon Press 1968

160 SHEPPARD H. and TSIEN W.H.: Metabolism of Reserpin-C^{14}. II. Species differences as studied in vitro. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 90,(1955): 437-440

161 SOLOMON H.M., SCHROGIE J.J. and WILLIAMS D.: The displacement of phenylbutazone-^{14}C and warfarin-^{14}C from human albumin by various drugs and fatty acids. Biochem.Pharmacol., 17,(1968):143-151

162 SPRING P.: Die Bindung einiger Sulfanilamide an die Bluteiweißkörper des Menschen. Arzneim.-Forsch., 16,(1966):346-354

163 [illegible] J.B., WILLIAMS W.D., DAVIDSON A.G., DOWNIE W. and WHALEY K.: The effect of antiinflammatory drugs on the protein-binding of 11-hydroxysteroids in human plasma in vitro. J.Pharm.Pharmacol., 21,(1969):451-459

164 STORMANN H.: Persönliche Mitteilung

165 STOUFFER J.E. and [illegible]: Structural relationship in the interaction of adrenocorticotropin with plasma proteins. Biochemistry, 5,(1966):1195-1201

166 TANFORD C., BUZZELL J.G., RANDS D.G. and SWANSON S.A.: The reversible expansion of bovine serum albumin in acid solutions. J.Amer.Chem.Soc., 77,(1955):6421-6428

167 TATA J.R.: A new aspect of the interaction between thyroxine and proteins. Biochem.J., 72,(1959):222-229

168 THORP J.M.: The influence of plasma proteins on the action of drugs. In "Absorption and distribution of drugs" (Binns T.B. ed.), 64-76, E.S. Livingstone Ltd., London 1964

169 TOWN B.W., WILLS E.D., WILSON E.J. and WORMALL A.: Studies on suramin. 8. The action of the drug on enzymes and some other proteins. General considerations. Biochem.J., 47,(1950):149-158

170 VERWEY W.F. and WILLIAMS H.R.: Binding of various penicillins by plasma and peripheral lymph obtained from dogs. Antimicrobial Agents and Chemotherapy - 1962, 484-491, Amer.Soc.Microbiol., Ann Arbor Michigan

171 VERWEY W.F., WILLIAMS H.R. and KALSOW C.: Penetration of chemotherapeutic agents into tissues. Antimicrobial Agents and Chemotherapy - 1965, 1016-1024, Amer.Soc.Microbiol., Ann Arbor, Michigan

172 VOGEL G. und LAUTERBACH F.: Über das Verhalten von Herzglykosiden in der Niere als Ursache ihrer unterschiedlichen diuretischen Aktivität. Arch.exp.Path.Pharmak., 244,(1963): 334-350

173 [illegible] K.v., SCHWARZ K. und [illegible] H.G.: [illegible]erumproteinbindung von ACTH. I. Untersuchungen mit Dextrangelfiltration und ^{3}H-ACTH. Klin.Wschr., 46,(1968):940-944

174 WILCOX P.E. and [illegible] J.: Applications of gel filtration in studies of protein-metal complexes. Fed.Proc., 19,(1960):333

175 WILSON J.B.: Acetylcholinesterase. In "The enzymes" (Boyer P.D., Lardy H., Myrbäck K. eds.), Vol.4, 501-520, Academic Press, New York - London 1960

176 WIEMAN T.H. and NELSON E.: Correlation of in vivo metabolism rate and physical properties of sulfonamides. J.Pharm.Sci., 53,(1964):992

177 WITZGALL H. und BOYENS H.: Die Bedeutung der Bindung an Albumin, Körperzellen und Bakterien für Pharmakodynamik und Wirkung von Arzneistoffen. Arch.int.Pharmacodyn., 148,(1964): 511-535

178 WÖHLER F. und SEECKMANN L.: Über Eiweißbindung, Blut-, Liquor- und Gewebsspiegle neuer Sulfonamide. Arzneim.-Forsch., 10,(1960):859-869

179 ZWAAN J. and van DAM A.F.: Rapid separation of fluorescent antisera and unconjugated dye. Acta Histochem., 11,(1961):306-308

Herrn Professor Dr. Rummel danke ich dafür, daß er es mir ermöglicht hat, die Arbeit in seinem Institut durchzuführen, sowie für die wertvolle Unterstützung bei der kritischen Diskussion der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Pfleger für die Überlassung des Themas sowie für die freundliche Anleitung und Beratung bei der Durchführung der Versuche und beim Abfassen der Arbeit.

Lebenslauf

Am 18.August 1943 wurde ich, Norbert Kolassa, als Sohn des Apothekers Dr.phil. et Mr.pharm. Walter Kolassa und seiner Ehefrau Mrs.pharm. Hilde Kolassa, geb. Elich in Wien geboren.

Von 1949 bis 1953 besuchte ich die Volksschule in Wien XVIII., Scheidlstr.2 und von 1953 bis 1961 das humanistische Gymnasium in Wien XXIII., Kollegium Kalksburg, wo ich am 6.Juni 1961 die Reifeprüfung mit Auszeichnung bestand.

An der Medizinischen Fakultät der Universität Wien begann ich im Wintersemester 1961/62 mit dem Medizinstudium, das ich mit der Erteilung des Absolutoriums im Sommersemester 1966 beendete. Nach Bestehen der Prüfungen des I., II. und III. medizinischen Rigorosums mit dem Gesamturteil "ausgezeichnet" wurde ich am 12.Juni 1967 an der Universität Wien zum Doktor der gesamten Heilkunde promoviert.

Am 1.September 1967 wurde ich zum Verwalter der Stelle eines Wissenschaftlichen Assistenten am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ruhr-Universität Bochum bestellt.

Im Juli 1968 erhielt ich die Möglichkeit, als Gast des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der Universität des Saarlandes meine Ausbildung zu ergänzen. Während dieses Studienaufenthaltes, der im März 1970 zu Ende gehen wird, führte ich die Arbeiten für eine Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes durch.